

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. R. Arnold
Abteilung für Innere Medizin, Schwerpunkt Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
Leiter: Prof. Dr. med. R. Arnold

**Nichtinvasive Parameter der Leberfibrogenese
bei Patienten mit chronischer Hepatitis C
im Vergleich zu Patienten mit Leberzirrhose und Kontrollpersonen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Dorlies Hettwer, geb. Scharmann
aus Münster/Westfalen

Marburg 2001

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 13.12.2001.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. R. Arnold

Referent: Prof. Dr. med. M. Katschinski

Korreferent: Prof. Dr. med. K. J. Klose

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
I.1. Klassifikation der Hepatitiden	1
I.2. Geschichte und Epidemiologie der Hepatitis C	1
I.3. Verlaufsformen der Hepatitis C	4
I.4. Komplikationen der chronisch aktiven Hepatitis C	5
I.5. Therapie	5
I.6. Fibrogenese der Leber	7
I.7. Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit	10
II. Patienten und Methodik	11
II.1. Patienten und Kontrollen	11
II.1.1. Patienten mit chronischer Hepatitis C	11
II.1.2. Patienten mit Leberzirrhose	12
II.1.3. Kontrollpersonen	12
II.2. Fibrosemarker	13
II.2.1. N-terminales Propeptid des Typ III Prokollagens (PIIINP)	13
II.2.1.1. Reagenzien und Geräte	13
II.2.1.2. Prinzip und Durchführung des Assays	13
II.2.2. Laminin	14
II.2.2.1. Reagenzien und Geräte	14
II.2.2.2. Prinzip und Durchführung des Assays	15
II.2.3. Hyaluronan	16
II.2.3.1. Reagenzien und Geräte	16
II.2.3.2. Prinzip und Durchführung des Assays	17
II.2.4. Zelluläres Fibronectin	18
II.2.4.1. Reagenzien und Geräte	18
II.2.4.2. Prinzip und Durchführung des Assays	19
II.3. Farbkodierte Duplexsonographie (FKDS) der Lebervenen	20
II.3.1. Beschreibung der Methode	20
II.3.2. Einteilung der Lebervenen-Flußprofile	21
II.3.3. Durchführung	22
II.4. Statistik	23

III.	Ergebnisse	25
III.1.	Anamnese	25
III.1.1.	Patienten mit chronischer Hepatitis C	25
III.1.2.	Patienten mit Leberzirrhose	27
III.2.	Vergleich der Patientengruppen	28
III.2.1.	N-terminales Propeptid des Typ III Prokollagens (PIIINP)	31
III.2.2.	Laminin	33
III.2.3.	Hyaluronan	35
III.2.4.	Zelluläres Fibronectin	37
III.2.5.	Alaninaminotransferase (ALT)	37
III.2.6.	Farbkodierte Duplexsonographie (FKDS) der Lebervenen	40
III.3.	Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern	42
III.3.1.	Korrelationen der Fibrosemarker untereinander	42
III.3.2.	Korrelationen der Fibrosemarker mit der FKDS	43
III.3.3.	Korrelationen der Fibrosemarker mit Routinelaborparametern	43
III.4.	Verlaufsbeobachtungen	46
III.4.1.	N-terminales Propeptid des Typ III Prokollagens (PIIINP)	46
III.4.2.	Laminin	47
III.4.3.	Hyaluronan	51
III.4.4.	Zelluläres Fibronectin	54
III.4.5.	Farbkodierte Duplexsonographie (FKDS) der Lebervenen	56
III.5.	Einzelverlaufsbeschreibungen	59
IV.	Diskussion	62
IV.1.	Bedeutung der Leberfibrogenese für die chronische Hepatitis C	62
IV.2.	Klinische Relevanz nichtinvasiver Parameter der Leberfibrose	62
IV.3.	Laborchemische Marker der Leberfibrose	63
IV.3.1.	N-terminales Propeptid des Typ III Prokollagens (PIIINP)	63
IV.3.1.1.	PIIINP im Vergleich der Patientengruppen	64
IV.3.1.2.	Verlaufsbeobachtungen	65
IV.3.1.3.	Aussagekraft des PIIINP	66
IV.3.2.	Laminin	67
IV.3.2.1.	Laminin im Vergleich der Patientengruppen	68
IV.3.2.2.	Verlaufsbeobachtungen	69

IV.3.2.3.	Aussagekraft des Laminins	70
IV.3.3.	Hyaluronan	71
IV.3.3.1.	Hyaluronan im Vergleich der Patientengruppen	72
IV.3.3.2.	Verlaufsbeobachtungen	73
IV.3.3.3.	Aussagekraft des Hyaluronans	74
IV.3.4.	Zelluläres Fibronectin	75
IV.3.4.1.	Zelluläres Fibronectin im Vergleich der Patientengruppen	76
IV.3.4.2.	Verlaufsbeobachtungen	77
IV.3.4.3.	Aussagekraft des zellulären Fibronectins	77
IV.3.5.	Korrelationen der Fibrosemarker untereinander	78
IV.3.6.	Korrelationen der Fibrosemarker mit Routinelaborparametern	79
IV.4.	Farbkodierte Duplexsonographie (FKDS) der Lebervenen	80
IV.4.1.	Klassifikationen der Lebervenen-Flußprofile	80
IV.4.2.	Entstehungsmechanismen der Flußprofile	84
IV.4.3.	Vergleich der Flußprofile in den Patientengruppen	85
IV.4.3.1.	Kontrollen	85
IV.4.3.2.	Patienten mit chronischer Hepatitis C	87
IV.4.3.3.	Patienten mit Leberzirrhose	88
IV.4.4.	Verlaufsbeobachtungen	90
IV.4.5.	Zusammenhänge der FKDS mit den Fibrosemarkern	91
IV.4.6.	Aussagekraft der FKDS im Hinblick auf die Leberfibrogenese	92
IV.5.	Kritik	93
V.	Zusammenfassung	96
VI.	Literaturverzeichnis	98
VII.	Anhang	120
VII.1.	Abkürzungsverzeichnis	120
VII.2.	Verzeichnis der akademischen Lehrer	121
VII.3.	Danksagung	122

I. Einleitung

I.1. Klassifikation der Hepatitiden

Die letzten Jahre brachten entscheidende Fortschritte in der Erforschung der Virushepatitiden. Mittlerweile sind 7 verschiedene Hepatitisviren identifiziert worden (Hepatitis A-G). Auf die 5 bekanntesten soll hier kurz eingegangen werden (Iwarson 1992, Blum 1994).

Zwischen den einzelnen Viruserkrankungen bestehen erhebliche Unterschiede in Bezug auf Übertragungsweg, Klinik und Langzeitverlauf. Während die Hepatitis A, ebenso wie die Hepatitis E, fäkal-oral übertragen wird, läßt sich bei der Hepatitis B, C, und D ein parenteraler Übertragungsweg feststellen.

Die beiden erstgenannten Viren können nur eine akute Hepatitis hervorrufen, sind also nicht in der Lage zu chronifizieren. Eine Infektion mit HBV, HCV und HDV dagegen nimmt häufig einen chronischen Verlauf. Während die Chronifizierungsrate bei der Hepatitis B im Erwachsenenalter 5-10% beträgt, liegt sie bei der Hepatitis C bei ca. 80% (Scheig 1998, Trautwein und Manns 1999).

I.2. Geschichte und Epidemiologie der Hepatitis C

Nach Entdeckung des Australia Antigens 1964 durch Blumberg mußte man feststellen, daß nur ein geringer Teil der transfusionsassoziierten Hepatitiden durch das Hepatitis B Virus hervorgerufen wurde. Da auch das wenige Jahre später identifizierte Hepatitis A Virus nicht für diese Fälle verantwortlich war, wurde ein neues unbekanntes Agens, das Non A Non B (NANB) Hepatitis Virus propagiert (vgl. Purcell 1993). Prince et al. gingen bereits 1974 von der Existenz eines zusätzlichen Virus, des Hepatitis C Virus, aus, nachdem sie bei einer Untersuchung an Patienten mit Posttransfusionshepatitis nur in weniger als 30% das HBsAg nachweisen konnten (Prince et al. 1974).

Neben der parenteral übertragenen Hepatitis C gibt es noch eine weitere Form der NANB Hepatitis, die fäkal-oral übertragene Hepatitis E. Sie wird v.a. durch kontaminiertes Trinkwasser übertragen und ähnelt in ihrem Verlauf der Hepatitis A. Komplikationen im Sinne einer fulminanten Hepatitis findet man gehäuft in der Schwangerschaft (Ramalingaswami und Purcell 1988).

Nach jahrelanger Suche gelang der Chiron Cooperation 1989 die Isolierung eines cDNA Klones aus dem Genom des NANB Hepatitis Virus, welches von diesem Zeitpunkt an Hepatitis C Virus genannt wurde (Choo et al. 1989).

Bei dem Hepatitis C Virus handelt es sich um ein kleines Einzelstrang RNA Virus mit einer Kapsel. Es besteht aus insgesamt ca. 10.000 Nukleotiden und weist Ähnlichkeit zu den Flaviviren auf. Aufgrund häufiger Mutationen besteht eine hohe genetische Variabilität, was dem Immunsystem des Wirtes die Viruselimination erschwert und somit die hohe Chronifizierungsrate erklärt. Auch die Entwicklung einer Vakzine wird dadurch erheblich kompliziert (Bréchet 1994, Zeuzem et al. 1995).

Die Isolierung eines cDNA Klones durch Choo und Mitarbeiter bildete die Grundlage zur Entwicklung spezifischer Tests. Zum Screening werden ELISAs (enzyme-linked immunosorbent assay) der 1. und 2. Generation verwendet. Sie weisen ebenso wie der RIBA (recombinant immunosorbent assay), der als Bestätigungstest dient, anti-HCV Antikörper nach (Kuo et al. 1989, Janot et al. 1990, Reesink et al. 1992). Diese Antikörper erscheinen teilweise erst nach einigen Wochen im Serum der Patienten (Alter et al. 1989, Marcellin 1999). Eine frühe Diagnose wurde durch direkten Virusnachweis mittels PCR (polymerase chain reaction) möglich (Weiner et al. 1990, Enomoto et al. 1991, Silva et al. 1994). Außerdem wurden Methoden zur Virusquantifizierung und Genotypbestimmung entwickelt, die als prognostische Parameter v.a. im Rahmen klinischer Studien eingesetzt werden (Kato et al. 1993, Ramalho et al. 2000).

Die epidemiologische Bedeutung der Hepatitis C zeigt sich in einer globalen Prävalenz von ca. 3% (je nach Region 0,1 bis 5%). In den industrialisierten Ländern ist die Hepatitis C für 70% der Fälle mit chronischer Hepatitis und für 20% der Fälle mit akuter Hepatitis verantwortlich (Manns 1999). 90% der transfusionsbedingten Hepatitiden und ca. 20% der sporadischen Hepatitisfälle wurden durch das NANB Hepatitis Virus hervorgerufen. Die meisten zeigten einen positiven HCV Antikörpertest (Dienstag und Alter 1986, Hofmann 1990).

Vor 1985 lag die Übertragungsrate bei Bluttransfusionen bei 5-10%, wurde dann durch Anwendung von unspezifischen Ersatztests wie ALT und Anti-HBc bei Blutspendern (Menitove 1988, Stevens et al. 1984) auf 2-4% reduziert und sank durch Einführung des Anti-HCV Tests weiter deutlich ab. Heute liegt das Risiko einer HCV Infektion bei Bluttransfusionen nur noch bei 1:100.000 (Hoofnagle und Tralka 1997). Wie man nach

Einführung des Anti-HCV Tests sah, sind 0,5% der Blutspender in den USA und Europa, 1,5% in Japan und 6% in Afrika positiv (Alter 1990).

Neben den Bluttransfusionen gibt es weitere Infektionsquellen der Hepatitis C. Hauptsächliche Risikogruppen sind: Hämophile, Drogenabhängige, Hämodialysepatienten und Homosexuelle (Steven und Colquhoun 1996, Zeuzem et al. 1995). Für medizinisches Personal besteht, anders als bei der Hepatitis B, nur ein gering erhöhtes Risiko (Hofmann und Kunz 1990). Welche Rolle der sexuelle Übertragungsweg spielt, ist noch unklar (Alter et al. 1989, Degos 1994, Strasser 1996).

Die jeweiligen Prävalenzen der einzelnen Patientengruppen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Prävalenzen der Hepatitis C bei unterschiedlichen Patientenkollektiven

	Prävalenz	Quelle
Blutspender	0,5% (Europa u. USA) 1,5% (Japan) 6,0% (Afrika)	Alter 1990
Transfusions- empfänger	5-10% (vor 1985) 2-4% (nach 1985) 1:100.000 (aktuell)	Alter 1990 Hoofnagle und Tralka 1997
Hämophile	70%, 85%, 56-76% nicht erhöht (aktuell)	Alter 1990, Ludlam et al. 1989, Noel et al. 1989 Alter 1990
Drogenabhängige	60-80%	Alter 1990, Degos 1994, Hoofnagle und Tralka 1997
Hämodialyse- patienten	17,3%, 20%, 24%	Gilli et al 1990, Degos 1994, Mondelli et al. 1990
Homosexuelle	4%	Alter 1990
med. Personal	2 fach erhöht	Hofmann und Kunz 1990

I.3. Verlaufsformen der Hepatitis C

Der Verlauf der Hepatitis C ist schleichend. Die Symptome sind unspezifisch, es findet sich nur in ca. 20% ein Ikterus in der Akutphase. Die akute Hepatitis C verläuft nach einer Inkubationszeit von 5-12 Wochen in 80-90% der Fälle asymptomatisch. Oft ist die Erhöhung der Transaminasen neben unspezifischer Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Unwohlsein das einzige Zeichen der Infektion (Caporaso et al. 1997, Maier 1994, Marcellin 1999). Dabei schwanken die Transaminasen charakteristischerweise, die Erkrankung verläuft also in Schüben (Colombo 1996, Wiese et al. 1987). Auch Verläufe mit normalen Transaminasenwerten kommen vor (Gholson et al. 1997, Morales et al. 1995, Persico et al. 2000).

Aufgrund häufiger viraler Mutationen gelingt es dem Immunsystem meistens nicht, das Virus zu eliminieren. Die Infektion mit dem Hepatitis C Virus führt in über 80% der Fälle zu einer chronischen Hepatitis, bei der die spontane Heilungsrate nur noch bei weniger als 2% liegt (Boyer und Marcellin 2000, Kiyosawa et al. 1994). Von einer chronischen Hepatitis spricht man, wenn die Erkrankung seit mindestens 6 Monaten besteht (Desmet et al. 1994).

Die chronische Hepatitis wird in chronisch persistierende (CPH) und chronisch aggressive Hepatitis (CAH) unterteilt (De Groote et al. 1968), wobei sich für die chronisch aggressive Hepatitis später die Bezeichnung chronisch aktive Hepatitis durchgesetzt hat (Bianchi et al. 1977). In den letzten Jahren wird allerdings der Forderung nach einer neuen Klassifikation Ausdruck verliehen. Bereits 1981 formulierten Knodell und Mitarbeiter einen Histologischen Aktivitätsindex (Knodell et al. 1981). Dieser wurde weiter modifiziert und bildete die Grundlage einer Klassifikation, die sich an der **Ätiologie** der Leberentzündung orientieren soll. Sie sieht außerdem ein **Grading** anhand der Entzündungsaktivität und ein **Staging**, das Aufschluß über den Fibrosegrad der Leber geben soll, vor (Desmet et al. 1994, Ishak et al. 1995, Schmid et al. 1994).

Histologisch zeigt die chronische Hepatitis C (chron. Hep. C) zwar kein pathognomonisches, aber dennoch ein charakteristisches Bild. Im Gegensatz zur Hepatitis B, bei der es sich mehr um eine lobuläre Entzündung handelt, findet sich bei der Hepatitis C eher eine portale Hepatitis. Man sieht v.a. Läsionen kleiner und mittlerer Gallengänge, portale Lymphfollikel und -aggregate, Leberzellverfettung und vergrößerte Makrophagen (Gerber et al. 1992).

I.4. **Komplikationen der chronisch aktiven Hepatitis C**

Die Infektion mit dem Hepatitis C Virus führt, wie oben erwähnt, in ca. 80% der Fälle zur chronischen Leberentzündung. Ihr Verlauf ist heimtückisch, da es trotz einer häufig über Jahre bestehenden asymptomatischen Phase im Langzeitverlauf zu schwerwiegenden Komplikationen kommen kann. Nach 10-30 Jahren besteht bei 20-30% der Patienten eine **Leberzirrhose**. Zwischen 2-6% der Patienten mit Leberzirrhose auf dem Boden einer chronischen Hepatitis C entwickeln jedes Jahr ein **hepatozelluläres Karzinom (HCC)** (Colombo 1999, De Bac et al. 1997, Di Bisceglie 1995, Maier 1994, Seef et al. 1992, Sterneck 2000, Tassopoulos 1996).

Bei der Zirrhose handelt es sich um die wichtigste Spätkomplikation der chronisch aktiven Hepatitis C. Neben der erhöhten Wahrscheinlichkeit der Entstehung eines HCC besteht die Gefahr der hepatischen Dekompensation. Dabei führen die perisinusoidale Fibrose und der noduläre Umbau des Leberparenchyms durch eine erhöhte Diffusionsbarriere und die Einengung des sinusoidalen Blutstroms zu lebensbedrohlichen Komplikationen. Es kommt zur metabolischen Insuffizienz mit der Folge einer hepatischen Enzephalopathie und zur portalen Hypertension mit der Entstehung von Umgehungskreisläufen. Folge sind Aszites und häufig die Ruptur von Ösophagusvarizen, was zu lebensgefährdenden Blutungen führen kann (Fattovich et al. 1997, Gressner 1985, Khan et al. 2000, Siringo et al. 1994).

I.5. **Therapie**

Aufgrund des häufig asymptomatischen Verlaufs der Hepatitis C stellt sich die Frage nach der Relevanz und dem Ziel einer Behandlung dieser Erkrankung. Die Frage stellt sich besonders, da noch keine optimale Therapie zur Verfügung steht.

Bereits 1986 machte Hoofnagle, noch vor der Identifizierung des Hepatitis C Virus, einen Therapieversuch der chronischen Non A Non B Hepatitis mit rekombinantem α -Interferon (Hoofnagle et al. 1986). Seitdem wurde diese Behandlung im Rahmen klinischer Studien untersucht (Brouwer et al. 1998, Marcellin et al. 1994, Reichard et al. 1994).

Die Interferontherapie soll, je nach Genotyp, über einen Zeitraum von 6 Monaten bis zu einem Jahr durchgeführt werden. Sie wird von einer ganzen Reihe von Nebenwirkungen wie grippeähnlichen Symptomen, Gelenkbeschwerden, Hautveränderungen, verminderter Leistungsfähigkeit, Gereiztheit und Depressionen begleitet. Diese Nebenwirkungen sind bei den einzelnen Patienten sehr unterschiedlich ausgeprägt und nach Absetzen

des Interferons zumeist reversibel. Auch die Induktion bzw. Exazerbation von Autoimmunerkrankungen durch Interferon wird beobachtet (Dusheiko 1997).

Ziel der Therapie ist es, durch direkte antivirale Effekte und Stimulation des Immunsystems eine Viruselimination zu erreichen (Zeuzem et al. 1995). Das bedeutet, daß der Patient zum einen nicht mehr infektiös ist und zum anderen die Komplikationen wie Leberzirrhose und HCC verhindert werden. Eine erfolgreiche Behandlung kann auch dann von erheblicher Relevanz sein, wenn der Patient bei der Diagnosestellung keine Symptome aufweist.

Die langfristige Erfolgsrate der Interferonbehandlung beträgt 20-25%. Initial antworten ca. 50% der Patienten mit einer Normalisierung der Transaminasen. Von ihnen erleiden aber nach Absetzen des Interferons mindestens 50% einen Rückfall (Brouwer et al. 1998, Hoofnagle und Tralka 1997, Niederau et al. 1996).

Neuerdings wird eine Kombinationstherapie mit Interferon und Ribavirin durchgeführt, durch die die dauerhafte virologische Ansprechrates auf bis zu 40% erhöht werden kann (Boyer und Marcellin 2000, Erhardt et al. 2000, Hoofnagle 1999).

Gute Erfolgsaussichten haben junge Patienten mit kurzer Krankheitsdauer und frühem Behandlungsbeginn, die noch keine Zirrhose aufweisen. Das Virämieausmaß, der HCV Genotyp, die Länge der Behandlung und die Dosis spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in Bezug auf die Erfolgswahrscheinlichkeit (Glück et al. 1997, Hino et al. 1994, Jenkins et al. 1996, Karino et al. 1991, Martinot-Peignoux et al. 1995).

Obwohl der größte Teil der Patienten nicht in erwünschtem Maße auf die Therapie anspricht, scheint es auch bei diesen Patienten nach der Behandlung zu einer Aktivitätsabnahme der Erkrankung zu kommen. Es kann von Vorteil sein, die Behandlung nach einem Rückfall zu wiederholen, da man gesehen hat, daß sich histologische Parameter der Entzündungsaktivität und der Fibrose dadurch verbessert haben (Duchatelle et al. 1998, Reichard et al. 1994, Yagura et al. 2000). Außerdem wird durch die Therapie eine Verringerung der fibrogenen Aktivität erreicht. Somit nimmt die Häufigkeit der Entstehung einer Leberzirrhose und des hepatozellulären Karzinoms ab (Benvegnù et al. 1998, Bonino et al. 1999, Camps et al. 1993).

I.6. Fibrogenese der Leber

Die Fibrose stellt ein wesentliches histologisches Kriterium der Leberzirrhose dar (Anthony et al. 1978). Ihre Entwicklung, also die Fibrogenese, ist eine klinisch bedeutsame Reaktion der Leber auf einen chronischen Reiz. Ein solcher Reiz geht u.a. von chronischem Alkoholabusus, aber auch von der chronischen Infektion mit einem Hepatitisvirus aus.

Da es sich, wie oben erwähnt, bei der Entwicklung einer Leberzirrhose um die wesentliche Komplikation der chronischen Hepatitis C handelt, soll hier näher auf die Fibrogenese eingegangen werden. Das Ausmaß und die Aktivität des fibrotischen Umbaus ist der wichtigste prognostische Faktor im Verlauf der chronischen Virushepatitis C. Es ist also von entscheidender Bedeutung, mehr über die Entstehungsmechanismen der Fibrose zu wissen, um so eine Verlaufskontrolle dieses Prozesses zu ermöglichen (Poynard et al. 1997).

Zu Beginn der 50er Jahre hielt man den Zerfall von Lebergewebe für den Hauptfaktor bei der Entstehung der Fibrose (Hartroft und Ridout 1951). Zehn Jahre später war für Popper die Proliferation von Fibroblasten mit der Produktion von neuem Kollagen der entscheidende Vorgang bei der Fibrogenese (Popper et al. 1961). Im gleichen Zeitraum konnte Wake in Japan eine neue Zellpopulation, die **perisinusoidalen Fettspeicherzellen**, identifizieren (Wake 1971), die zuvor bereits durch Ito beschrieben worden waren (Ito und Nemoto 1952). Diese Nichtparenchymzellen der Leber erregten in den folgenden Jahren großes Interesse.

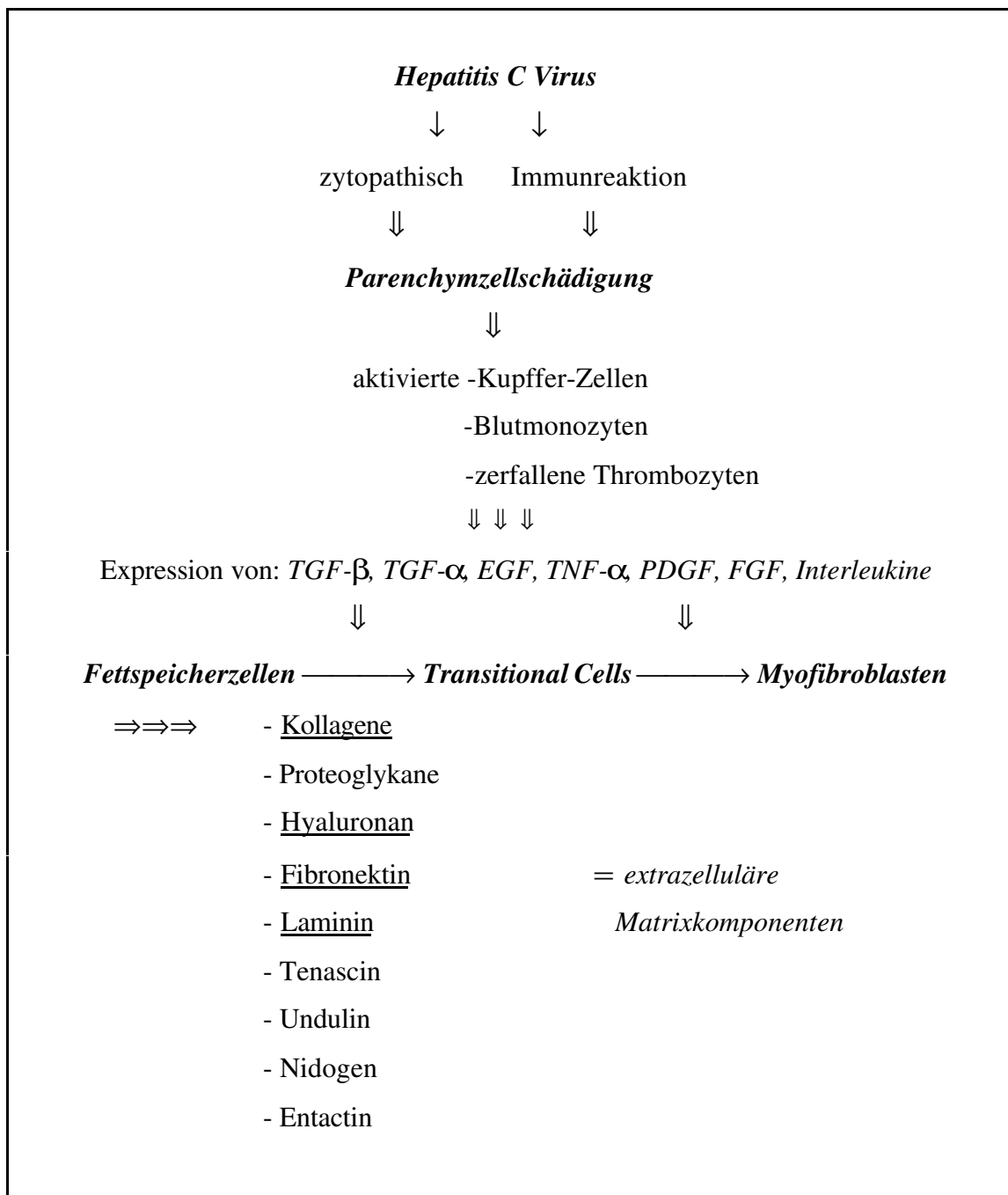
Heute weiß man, daß diese Zellen durch komplexe Interaktionen mit aktivierten Kupffer-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen und desintegrierten Thrombozyten über von diesen exprimierte Zytokine aktiviert werden und für die Produktion von extrazellulärer Matrix verantwortlich sind (Gressner 1986, Gressner und Bachem 1995, Pinzani 1995). Letztere setzt sich zusammen aus folgenden 3 Hauptkomponenten: Kollagene, Proteoglykane und Glykoproteine. Zu den Glykoproteinen gehören z.B. das Laminin und das Fibronectin (Biagini und Ballardini 1989).

Die Infektion mit dem Hepatitis C Virus führt zur Parenchymzellschädigung, die zum einen auf einem direkten zytopathischen Effekt des HCV, zum anderen auf Immunmechanismen als Reaktion auf die Infektion beruht. Der vorherrschende Zelltyp sind T-Lymphozyten. Außerdem scheinen Makrophagen/Monozyten eine Rolle bei der Zellschädigung zu spielen (Gerber 1995, Lau 1998, Marrogi et al. 1995).

Als Folge der Parenchymzellschädigung kommt es zur Aktivierung von Kupffer-Zellen und Blutmonozyten. Sie synthetisieren Zytokine wie Transforming Growth Factor- $(\text{TGF-}\beta)$, $\text{TGF-}\alpha$, Epidermal Growth Factor (EGF), Tumornekrosefaktor- $(\text{TNF-}\alpha)$, Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Fibroblast Growth Factor (FGF) und Interleukine, die auf parakrinem Wege die Proliferation der Fettspeicherzellen (Ito-Zellen) beeinflussen. Zudem bewirken sie deren Transformation über „Transitional Cells“ zu Myofibroblasten sowie die Genexpression spezifischer Matrixmoleküle der Myofibroblasten (Gressner 1992, Gressner und Bachem 1994 und 1995). $\text{TGF-}\beta$ ist als fibrogener Mediator von besonderer Bedeutung, da es die Transformation in hohem Maße stimuliert und die Genexpression nahezu aller Matrixkomponenten erhöht. Auf seine Expression in Form einer inaktiven Vorstufe folgt eine extrazelluläre Prozessierung durch Proteasen oder Glykosidasen, wodurch weitere Regulationsmöglichkeiten des fibrogenen Prozesses entstehen (Bachem et al. 1994, Koff 1991, Massagué et al. 1990).

An der Transformation von Fettspeicherzellen zu Myofibroblasten sind weitere parakrine und autokrine Regelkreise beteiligt. Es handelt sich um ein wesentlich komplexeres Zusammenspiel von Parenchym- und Nichtparenchymzellen, Mediatoren und extrazellulärer Matrix als hier dargestellt.

Abbildung 1 soll die Vorgänge in vereinfachter Weise verdeutlichen.

Abb. 1: Pathomechanismus der Fibrogenese

I.7. Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit

Im Hinblick auf die Prognose und Therapie der chronischen Hepatitis C mit antiviralen oder immunmodulierenden Substanzen wie Interferon und Ribavirin ist eine effektive Verlaufskontrolle von Fibroseausmaß und -aktivität wichtig, da sich im Laufe der Erkrankung aus einer fortschreitenden Fibrose der Leber eine Leberzirrhose mit lebensbedrohlichen Komplikationen entwickeln kann (Anthony et al. 1978, Hahn und Pencev 1981, Poynard et al. 1997).

Als Goldstandard zur Beurteilung der Krankheitsaktivität gilt die Leberbiopsie. Da die Biopsie eine invasive Methode der Diagnostik darstellt, die zur Verlaufskontrolle nicht beliebig wiederholbar ist, und es zudem untersucher- und probenabhängig Variationen in der Bewertung der Lebermorphologie geben kann (Bedossa et al. 1994, Abdi et al. 1979), beschäftigt sich diese Arbeit mit nichtinvasiven Parametern der Leberfibrose und -fibrogenese. Dabei handelt es sich um Blut- und Serummarker wie **N-terminales Propeptid des Typ III Prokollagens (PIIINP)**, **Laminin**, **Hyaluronan**, **zelluläres Fibronektin** und um die semiquantitative **farbkodierte Duplexsonographie (FKDS) der Lebervenen**.

Diese Arbeit untersucht sowohl die Aussagekraft der oben angegebenen Laborparameter als auch der Duplexsonographie bei Patienten mit chronischer Hepatitis C über den Zeitraum von bis zu 12 Monaten. Zum Vergleich wurden Patienten mit Leberzirrhose und lebergesunde Kontrollpersonen untersucht. Das Ziel ist, die Relevanz dieser nichtinvasiven Verlaufsparemeter gegenüber klinischen Befunden, klinisch-chemischen Labormarkern der Entzündungsaktivität und Synthesefunktion der Leber und der Leberhistologie zu prüfen.

Mit dieser Untersuchung soll geklärt werden, ob sich die Fibrosemarker aus dem Blut und Serum bei Patienten mit chronischer Hepatitis C von denen bei Patienten mit Leberzirrhose und lebergesunden Kontrollpersonen unterscheiden. Zusätzlich soll die Aussage der semiquantitativen Duplexsonographie der Lebervenen in Bezug auf das Fibroseausmaß bei den genannten Patientengruppen im Vergleich zu Kontrollen untersucht werden.

Verlaufsbeobachtungen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C und Patienten mit Leberzirrhose unterschiedlicher Ätiologie sollen Veränderungen der untersuchten Fibrosemarker und der Duplexsonographie im zeitlichen Verlauf zeigen.

II. Patienten und Methodik

II.1. Patienten und Kontrollen

Im Rahmen einer prospektiven Untersuchung nahmen die im folgenden aufgeführten Patientengruppen im Zeitraum von März 1995 bis März 1997 teil. Sie wurden jeweils an einem Termin und teilweise über einen Verlauf von 3 bis 12 Monaten beobachtet. Dabei unterzogen sie sich zweimal im Abstand von 3 bis 10 Monaten einer Ultraschalluntersuchung, der farbkodierten Duplexsonographie (FKDS) der Lebervenen. Sie erschienen mindestens dreimal, und zwar zum Zeitpunkt 0, nach 1-3 Monaten und nach 3-12 Monaten zur Verlaufskontrolle. Dabei wurden klinische Daten aufgenommen und Blutentnahmen durchgeführt. Im Rahmen der Labordiagnostik wurden die zu untersuchenden Marker der Fibrose (N-terminales Propeptid des Typ III Prokollagens (PIIINP), Laminin, Hyaluronan und zelluläres Fibronectin) sowie Entzündungs- und Synthesemarker wie AST, ALT, AP, γ GT, Albumin, PCHE, Bilirubin, Quick und PTT bestimmt.

II.1.1. Patienten mit chronischer Hepatitis C

Dabei handelt es sich um 59 Patienten der gastroenterologischen Ambulanz mit chronischer Hepatitis C, d.h. die Erkrankung bestand schon seit mindestens 6 Monaten. Die Gruppe umfaßt 24 Frauen und 35 Männer im Alter zwischen 26 und 76 Jahren. Elf dieser Patienten unterzogen sich während des Beobachtungszeitraumes oder in den vorangehenden 2 Jahren für mehr als 3 Monate einer Interferontherapie mit 3x3 Mio. IE α -Interferon 2a s.c. (Roferon der Firma Hoffmann La Roche, Schweiz).

Nach dem Grad der Entzündungsaktivität konnten die Patienten eingeteilt werden in:

Chronisch persistierende Hepatitis (CPH): 42 Patienten (davon bei 30 Pat. bioptisch gesichert, bei 12 Pat. Einordnung nach anamnestischen, klinischen und laborchemischen Kriterien)

Chronisch aktive Hepatitis (CAH): 17 Patienten (bioptisch gesichert)

Alle Patienten wiesen einen positiven HCV Antikörpertest auf. Dieser wurde nach dem Prinzip eines Mikropartikel-Enzymimmunoassays (MEIA) (IMX-Immunoassayanalyser der Firma Abbott, Wiesbaden) durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen Nachfolger des ELISA, bei dem das Antigen in Flüssigform in Mikropartikeln vorliegt.

Als Bestätigungstest diente der Anti-HCV Matrix-Test (Matrix system analyzer der Firma Abbott, Wiesbaden), bei dem es sich vom Prinzip um einen Immunodotassay mit rekombinanten HCV-Proteinen (RIBA) handelt.

Der direkte Virusnachweis wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt (Amplicor HCV qualitativ der Firma Roche Diagnostic Systems GmbH, Grenzach).

Dabei wurden 47 Patienten positiv getestet, 2 waren negativ und bei 10 Patienten lag das Ergebnis einer Testung mittels PCR nicht vor.

II.1.2. Patienten mit Leberzirrhose

Zu dieser Gruppe gehören 50 Patienten mit Leberzirrhose unterschiedlicher Ätiologie. Dabei wurden Patienten mit bekanntem hepatozellulärem Karzinom ausgeschlossen. 21 Patienten unterzogen sich einer Leberbiopsie. Bei den übrigen wurde die Diagnose anhand anamnestischer, klinischer, sonographischer sowie laborchemischer Befunde gestellt.

Die Gruppe umfaßt 15 Frauen und 35 Männer im Alter zwischen 34 und 83 Jahren.

Nach dem Schweregrad der Leberzirrhose wurden die Patienten nach der Klassifikation von Child und Pugh (Pugh et al. 1973) folgendermaßen eingeteilt:

Child A:	21 Patienten
Child B:	15 Patienten
Child C:	14 Patienten

II.1.3. Kontrollpersonen

Als Kontrollpersonen stellten sich 15 Mitarbeiter des Instituts und Studenten zur Verfügung, bei denen keine Lebererkrankung vorlag. Die Gruppe umfaßt 8 Frauen und 7 Männer im Alter zwischen 22 und 34 Jahren.

II.2. Fibrosemarker

II.2.1. N-terminales Propeptid des Typ III Prokollagens (PIIINP)

II.2.1.1. Reagenzien und Geräte

Reagenzien: RIA-gnost® PIIIP

(Firma CIS bio international, Cedex-Frankreich)

7 Standards (S₀-S₆) und 1 Kontrollserum, 2 Puffertabletten für Waschpuffer, 1 ml Dispenser, Röhrchen mit wandgebundenem monoklonalem Anti-PIIIP Antikörper der Maus, ¹²⁵I-markierter Anti-PIIIP Antikörper (monoklonal, Maus).

Vorbereitung der Reagenzien

Vor Gebrauch wurden die bei 2-8°C gelagerten Besteckkomponenten auf Raumtemperatur gebracht. Die Standards und das Kontrollserum wurden in 500 µl H₂O dest. gelöst. Zur Herstellung des Waschpuffers wurden die 2 Puffertabletten in 600 ml destilliertem Wasser gelöst.

Geräte

20µl, 400µl Pipetten mit austauschbarer Kunststoffspitze, Meßzylinder, Horizontalschüttler, Gammazähler (Berthold, Bad Wildbad).

Vorbereitung der Proben

Nach der Blutentnahme wurde nach den üblichen Verfahren Serum gewonnen. Dieses wurde direkt in den Assay eingesetzt oder bis zu 3 Tage bei 2-8°C aufbewahrt. Mußte es länger gelagert werden, wurde es bei -20°C eingefroren.

II.2.1.2. Prinzip und Durchführung des Assays

Prinzip

Die Bestimmung von Prokollagen III Peptid im menschlichen Serum mit Hilfe von RIA-gnost® PIIIP erfolgte nach dem Prinzip eines **2-Schritt-Sandwich-Radioimmunoassays**. Hierbei bildet sich ein Komplex aus wandgebundenem Anti-PIIIP Antikörper (monoklonal, Maus), Prokollagen III Propeptid in der Probe und ¹²⁵I-markiertem Anti-PIIIP Antikörper (monoklonal, Maus). Nach Ablauf der Reaktion wird der freie Traceranteil durch Dekantieren und Nachwaschen entfernt. Der spezifisch an den

beschichteten Teströhrchen gebundene Traceranteil wird mit einem Gammazähler gemessen.

Die Auswertung der unbekannten Proben erfolgt durch Ablesung an einer unter identischen Bedingungen erstellten Standardkurve. Bei Erstellung einer Standardkurve werden unter Durchführung von Doppelbestimmungen maximal 42 Patientenproben gemessen.

Durchführung

Eine genügende Anzahl von beschichteten Röhrchen wurde numeriert (7 Standards, 1 Kontrollserum, bis zu 42 Serumproben).

20 µl Standard bzw. Patientenprobe wurden auf den Boden der beschichteten Röhrchen pipettiert.

In jedes Röhrchen wurden 400 µl Assaypuffer gegeben.

Die Röhrchen wurden anschließend auf einem Horizontalschüttler 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 200-350 Umdrehungen pro Minute geschüttelt.

Danach wurde in jedes Röhrchen 1 ml Waschpuffer pipettiert, dekantiert und mit 1 ml Waschpuffer nachgewaschen.

In jedes Röhrchen wurden 400 µl ^{125}I -Anti-PIIIP Lösung dispensiert.

Die Röhrchen wurden anschließend auf einem Horizontalschüttler 3 Stunden mit 200-350 Umdrehungen pro Minute geschüttelt.

Danach wurde in jedes Röhrchen 1 ml Waschpuffer gegeben, dekantiert und mit 1 ml Waschpuffer nachgewaschen.

Die Aktivität in den Röhrchen wurden dann 1 Minute im Gammazähler gemessen.

II.2.2. Laminin

II.2.2.1. Reagenzien und Geräte

Reagenzien: RIA-gnost® Laminin P1

(Firma CIS bio international, Cedex-Frankreich)

8 Standards (S_0 - S_7) und 1 Kontrollserum, ^{125}I -Laminin P1, Anti-Laminin P1 Serum vom Kaninchen, Fällungsreagenz (gegen Kaninchen IgG gerichteter Antikörper), 30 ml Waschpufferkonzentrat.

Vorbereitung der Reagenzien

Vor Gebrauch wurden die bei 2-8°C gelagerten Besteckkomponenten auf Raumtemperatur gebracht. Während die Standards und das Fällungsreagenz gebrauchsfertig waren, wurden die übrigen Reagenzien in destilliertem Wasser gelöst. Zum Kontrollserum wurden 1,3 ml, zum ^{125}I -Laminin P1 10 ml, zum Anti-Laminin P1 Serum 20 ml und zum Waschpufferkonzentrat 120 ml destilliertes Wasser hinzugefügt.

Geräte

3-5 ml Inkubationsröhrchen, Mikroliterpipetten mit austauschbarer Kunststoffspitze (200 μl , 500 μl und 1 ml), Meßpipetten, Meßzylinder (10, 20 und 100 ml), Mischrotor, Zentrifuge mit $\geq 1500\text{ g}$ (Heraeus, Hanau), Gammazähler (Berthold, Bad Wildbad).

Vorbereitung der Proben

Nach der Blutentnahme wurde nach den üblichen Verfahren Serum gewonnen. Dieses wurde direkt in den Assay eingesetzt oder bis zu 3 Tage bei 2-8°C aufbewahrt. Mußte es länger gelagert werden, wurde es bei -20°C eingefroren.

II.2.2.2. Prinzip und Durchführung des Assays

Prinzip

Die Bestimmung von Laminin war auf dem Prinzip der *kompetitiven Proteinbindungsanalyse* aufgebaut, methodisch handelt es sich um einen *Doppelantikörper-Radioimmunoassay*. Im ersten Schritt konkurriert Serum-Laminin mit extern zugefügtem radioaktiv markiertem Laminin P1 um hochspezifische gegen Laminin gerichtete Kaninchenantikörper. Dabei bindet ^{125}I -markiertes Laminin P1 umgekehrt proportional zu der vorhandenen Menge Serumlaminin an den Antikörper. Nach Einstellung des Reaktionsgleichgewichts wird zur Ausfällung dieses Immunkomplexes ein zweiter, gegen Kaninchen IgG gerichteter, Antikörper zugefügt. Es kommt zur Ausfällung eines Präzipitates, das abzentrifugiert wird. Nach Dekantieren des Überstandes mißt man die im Niederschlag vorhandene ^{125}I -Aktivität im Gammazähler. Diese ist umgekehrt proportional zur Lamininkonzentration im Serum.

Mit Hilfe einer Standardkurve kann die gesuchte Laminin P1-Konzentration pro Milliliter Serum abgelesen werden. Die Standardkurve wird erstellt, indem die Impulse pro Minute der Standards gegen die zugehörige Laminin P1-Konzentration (E/ml) (log) in ein Millimeterpapier eingetragen werden.

Durchführung

Eine genügende Anzahl von 3-5 ml Inkubationsröhrchen wurde numeriert (Gesamtaktivität, 8 Standards, Doppelansätze Serumproben).

200 µl Standards, Kontrollserum und Serumproben wurden in die dafür vorbereiteten Röhrchen pipettiert.

100 µl der ¹²⁵I-Laminin P1-Lösung wurden in jedes Röhrchen (einschließlich Gesamtaktivität) pipettiert.

200 µl des Anti-Laminin P1 Serums wurden in jedes Röhrchen (ausschließlich Gesamtaktivität) gegeben. Die Röhrchen wurden auf dem Mischrotor gemischt.

Das gesamte Reagenzglasgestell wurde mit einer geeigneten Folie abgedeckt und 16-24 h bei Raumtemperatur inkubiert.

500 µl des Fällungsreagenzes wurden in jedes Röhrchen (Ausnahme Gesamtaktivität) dispensiert und auf dem Mischrotor gemischt.

Das gesamte Reagenzglasgestell wurde erneut mit einer geeigneten Folie abgedeckt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden die Röhrchen 20 Minuten bei mindestens 1500 g bei ca. 10-20°C zentrifugiert.

Sofort nach dem Stillstand der Zentrifuge wurden die Gestelle mit den Röhrchen entnommen und die Überstände dekantiert.

1 ml Waschpuffer wurde in jedes Röhrchen pipettiert, und die Röhrchen wurden nochmals 20 Minuten bei mindestens 1500 g bei ca. 10-20°C zentrifugiert.

Die Gestelle mit den Röhrchen wurden sofort nach dem Stillstand der Zentrifuge entnommen und die Überstände dekantiert.

Die Röhrchen mit Niederschlag und Gesamtaktivität wurden im Gammazähler 60 Sekunden gemessen.

II.2.3. Hyaluronan

II.2.3.1. Reagenzien und Geräte

Reagenzien: Pharmacia HA

(Pharmacia AB, Uppsala, Schweden)

6 Standards (0, 10, 25, 75, 200, 500 µg/l HA), Hyaluronanbindungsprotein (HABP)-¹²⁵I,

15 ml Tracer Lösung, 6 ml HA-Sepharose®, 220 ml Dekantiersuspension.

Vorbereitung der Reagenzien

Zum HABP-¹²⁵I wurde im Verhältnis 1:30 Tracer Lösung hinzugegeben. Die übrigen Reagenzien waren bereits gebrauchsfertig.

Geräte

100 µl Mikroliterpipette mit austauschbarer Kunststoffspitze, 100 µl und 200 µl Saugpipetten, 2 ml Cornwall Spritze oder Pipette, Teströhrchen, Zentrifuge mit 1500 g (Heraeus, Hanau), Gammazähler (Berthold, Bad Wildbad).

Vorbereitung der Proben

Nach der Blutentnahme wurde nach den üblichen Verfahren Serum gewonnen. Dieses wurde direkt in den Assay eingesetzt oder bis zu 24 h bei 2-8°C aufbewahrt. Mußte es länger gelagert werden, wurde es bei -20°C eingefroren.

II.2.3.2. Prinzip und Durchführung des Assays

Prinzip

Die Bestimmung der Hyaluronsäure im menschlichen Serum erfolgte nach dem Prinzip eines *radiometrischen Assays*. Dabei reagiert das Hyaluronan in der Patientenprobe mit radioaktiv markiertem Hyaluronsäurebindungsprotein (HABP). Das ungebundene HABP-¹²⁵I wird durch Inkubation mit an Sepharose® Partikeln geringer Größe und Dichte gebundenem HA quantifiziert. Nach der Trennung durch Zentrifugation und Dekantieren wird die an die Partikel gebundene Radioaktivität mit Hilfe eines Gammazählers bestimmt. Sie ist umgekehrt proportional zur HA-Konzentration in der Probe.

Mit Hilfe einer Standardkurve kann die gesuchte HA-Konzentration pro Liter Serum abgelesen werden. Die Standardkurve wird erstellt, indem die Impulse pro Minute der Standards gegen die zugehörige HA-Konzentration in µg/l in ein Millimeterpapier eingetragen wird. Dabei werden die Impulse (B) in Prozent der gezählten Impulse des 0-Standards (B₀) angegeben: **% Aktivität = B / B₀ x 100**

Durchführung

100 µl Standard bzw. Patientenprobe wurden in die numerierten Röhrchen pipettiert.

200 µl der HABP-¹²⁵I-Lösung wurden hinzugefügt.

Es wurde für mindestens 60 Minuten bei 4-10°C inkubiert.

100 µl HA-Sepharose® wurde hinzugefügt, nachdem sie vorher resuspendiert wurde.

Es wurde für 45 Minuten (nicht länger als 60 Minuten) bei 4-10°C inkubiert.

2 ml der Dekantiersuspension wurden hinzugefügt.

Danach wurden die Röhrchen 10 Minuten bei 1500 g zentrifugiert und im Anschluß dekantiert.

Die Radioaktivität wurde in einem Gammazähler gemessen.

II.2.4. Zelluläres Fibronectin (cFN)

II.2.4.1. Reagenzien und Geräte

Reagenzien:

4,7-Bis(chlorosulfofenyl)-1,10-Phenantrolin-2,9-Dicarboxylinsäure (BCPDA), Biotin/Streptavidin (SA) (Sigma, Deisenhofen), cFN der Ratte, Gelatine-Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Schweden), monoklonaler Anti-cFN Antikörper DH1 (ICN, Meckenheim oder Locus Genex, Helsinki, Finnland), anti humanes FN Antiserum (polyklonal des Kaninchens) (Behring, Marburg), Anti-Maus IgG Antikörper, biotinylierter Anti-Maus und Anti-Kaninchen Antikörper (Sigma, Deisenhofen), Harnstoff/Natriumdodezylsulfat (SDS), Europiumionen (Eu^{3+}), NaHCO_3 -Lösung (0,05 mol/l), Waschlösung, Pufferlösung.

Vorbereitung der Reagenzien

Vor Gebrauch wurden die bei 4°C gelagerten Besteckkomponenten auf Raumtemperatur gebracht. Die Waschlösung wurde aus 9 g/l NaCl, 0,5 g/l Tween 20 und 0,5 g/l NaN_3 hergestellt. Für den Puffer wurden 5 g Rinderserumalbumin, 0,05 g NaN_3 und 0,05 mol Tris in 1 l H_2O aufgelöst und der pH-Wert auf 7,7 eingestellt.

Zur Herstellung der Standards wurde cFN aus Zellkulturen von Rattenfibroblasten gewonnen.

Geräte

Milenia Kinetic Analyser (Biermann, Bad Nauheim), Arcus 1230 zeitauflösendes Fluorometer (LKB Wallac, Turku, Finnland), Schütteltisch, Mikrotiterplatten.

Vorbereitung der Proben

Nach Blutentnahme in Natrium EDTA Röhrchen wurde nach den üblichen Verfahren Plasma gewonnen. Auch eine Verwendung von Zitratblut ist möglich. Dieses wurde direkt in den Assay eingesetzt oder bis zur Durchführung des Assays bei -80°C gelagert. Die Proben wurden 1:10 in Assaypuffer verdünnt, um den Meßbereich des Assays zu erreichen.

II.2.4.2. Prinzip und Durchführung des Assays

Prinzip

Die Bestimmung von zellulärem Fibronectin im menschlichen Plasma erfolgte nach dem Prinzip eines *Sandwich-Immunoassays* (s. Kropf und Gressner 1995). Hierbei bildet sich ein Komplex aus an Mikrotiterplatten gebundenem monoklonalem Anti-cFN Antikörper DH1 gegen die für das zelluläre Fibronectin charakteristische EDA Sequenz, zellulärem Fibronectin in der Probe und Anti-FN Antiserum (polyklonal, Kaninchen). Nach Ablauf der Reaktion wird der freie Anteil durch Dekantieren und Nachwaschen entfernt. Der spezifisch gebundene Anteil wird in Lösung gebracht und mittels zeitauflösender Fluoreszenzspektrophotometrie durch Messung komplexgebundener Europiumionen erfaßt (s. Kropf et al. 1991).

Die Auswertung der unbekannten Proben erfolgt durch Ablesung an einer unter identischen Bedingungen erstellten Standardkurve. Bei Erstellung einer Standardkurve werden unter Durchführung von Doppelbestimmungen maximal 42 Patientenproben gemessen.

Durchführung

Die Mikrotiterplatten wurden zunächst mit einer NaHCO₃-Lösung und Anti-Maus IgG Antikörper beschichtet. Diese wurden mit Anti-cFN Antikörper für 2 Stunden in Assaypuffer inkubiert. Nach Waschung wurden die Platten mit Assaypuffer blockiert und zunächst bei 4°C gelagert.

Standards und Proben wurden in Assaypuffer verdünnt und für eine Stunde inkubiert.

Danach wurde 1:200 verdünntes Antiserum für 1 Stunde hinzugefügt.

Es folgten Inkubationen mit biotinyliertem Kaninchenantikörper, 1:2000 verdünnt, und SA-BCPDA für jeweils 30 Minuten.

Die Platten wurden zwischen den Inkubationen jeweils dreimal gewaschen.

Die Komplexe wurden aus der festen Phase in einer Lösung von 4 mol Harnstoff, 10 g/l SDS und 10^{-6} mol Eu^{3+} über 30 Minuten gelöst. Mit Hilfe der zeitauflösenden Fluoreszenz-Spektrophotometrie wurde die Fluoreszenz des komplexgebundenen Europiums gemessen.

II.3. Farbkodierte Duplexsonographie (FKDS) der Lebervenen

II.3.1. Beschreibung der Methode

Das Flußprofil der Lebervenen wurde mittels farbkodierter Duplexsonographie untersucht. Bei der Duplexsonographie handelt es sich um eine Kombination aus amplitudenmodulierter B-Bild-Sonographie und Dopplertechnik, die eine simultane zweidimensionale Abbildung von Weichteilstrukturen und Blutströmungen ermöglicht. Zur Erfassung von Bewegungen werden die Frequenz- und Phasenverschiebung mittels gepulster Dopplertechnik gemessen. Das Signal wird dabei von den sich im Blutstrom bewegendem Erythrozyten reflektiert. Bei der farbkodierten Duplexsonographie werden die Informationen über die Blutbewegung im Grauwertbild farbig dargestellt.

Verschiedene Farben (z.B. rot oder blau) zeigen jeweils die Strömungsrichtung in Bezug auf die Transducerposition an. Dabei wird ein Blutfluß in Richtung des Schallkopfes meist definitionsgemäß rot dargestellt, der Fluß in die entgegengesetzte Richtung blau. Die Höhe der Frequenzverschiebung und damit die Flußgeschwindigkeit wird durch die Helligkeit der Farben kodiert. Man erhält somit in Echtzeit eine simultane zweidimensionale Darstellung von Blutströmungen und echomorphologischen Weichteilstrukturen.

Die Darstellung des Frequenzspektrums erfolgt quantitativ mit Hilfe des Doppler-Modes. Dabei wird die Blutflußgeschwindigkeit gegen die Zeit in einer Kurve aufgezeichnet. Ein Fluß in Richtung des Schallkopfes wird definitionsgemäß positiv, ein Fluß in die entgegengesetzte Richtung negativ dargestellt.

II.3.2. Einteilung der Lebervenen-Flußprofile

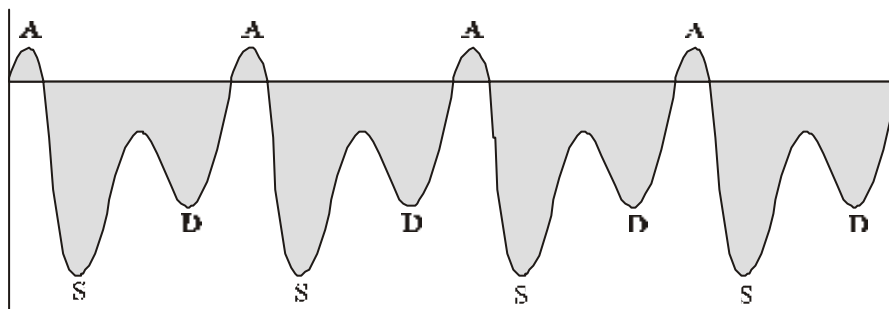
Normales Flußprofil der Lebervenen

Das normale Flußprofil der Lebervenen entsteht durch Druckveränderungen im rechten Vorhof. Es handelt sich um einen triphasischen Fluß, da 3 verschiedene Wellen, eine positive und 2 negative, voneinander abgrenzbar sind (Abb. 2).

Die A-Welle stellt sich positiv dar, weil sie einen Fluß in Richtung des Schallkopfes anzeigt. Sie entsteht während der atrialen Systole, in der es kurzzeitig zu einem Blutrückfluß in die Lebervenen („reverse flow“) kommt.

Die ventrikuläre Systole (S-Welle) und der frühe Anteil der ventrikulären Diastole (D-Welle) dagegen bedingen jeweils einen Blutfluß aus den Lebervenen zum Herzen und stellen sich negativ dar (Abu-Yousef 1992, Coulden et al. 1992, Morikawa 1991).

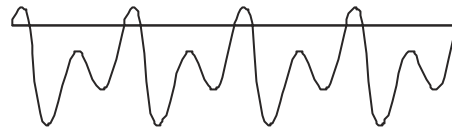
Abb. 2.: Normales triphasisches Lebervenen-Flußprofil



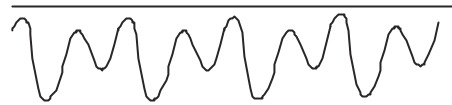
Pathologische Flußprofile der Lebervenen

Bei verschiedenen Lebererkrankungen gibt es Abweichungen von dem normalen triphasischen Muster. Das Spektrum reicht von einem biphasischen Fluß mit fehlendem „reverse flow“ über einen monophasischen nur noch leicht gewellten Fluß bis zu einem kaum noch nachweisbaren flachen Flußprofil. In den verschiedenen Studien werden unterschiedliche Klassifikationen des Lebervenen-Flußprofils propagiert. In dieser Arbeit wurde eine Kombination aus der Einteilung einer italienischen (Bolondi et al. 1991) und einer japanischen Arbeitsgruppe (Ohta et al. 1994) gewählt, die folgende Flußprofile unterscheidet:

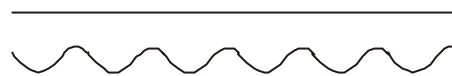
Normales Lebervenenprofil: **HV 0** Triphasischer Fluß



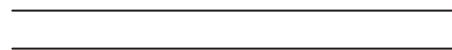
Abnormales Lebervenenprofil: **HV 1a** Biphasischer Fluß, fehlender „reverse flow“



HV 1b leicht gewellter Fluß



HV 2 flacher Fluß



II.3.3. Durchführung

Die farbkodierten Dopplerflußanalysen der Lebervenen wurden mit 2 Ultraschallgeräten der Firmen Acuson, Gerätetyp 128, und Hitachi, Gerätetyp CS 192, mit einem 3,5 Mhz Schallkopf durchgeführt. Dabei handelt es sich jeweils um ein Real-time-B-Bild-System mit integriertem gepulsten (PW) Doppler und der Möglichkeit, diesen farbkodiert darzustellen. Es wurde ein Wandfilter von 125 Hz verwandt. Die Untersuchung wurde durch 3 mit der Methode erfahrene Untersucher durchgeführt. Dabei wurde die Sonde durch einen sub- bzw. interkostalen Zugang im proximalen bis mittleren Drittel der rechten Lebervene in einem Winkel $< 50^\circ$ plaziert und das Dopplerflußsignal aufgezeichnet. Die Patienten wurden in liegender Position untersucht und aufgefordert, in der Expirationsphase den Atem anzuhalten.

II.4. Statistik

Die Fibrosemarker und die ALT wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests auf Normalverteilung geprüft. Es wurden sowohl die 3 Gruppen (Kontrolle, Chron. Hep. C und Leberzirrhose) gesondert als auch als Gesamtheit getestet. Da nicht bei allen Gruppen die Nullhypothese der Normalverteilung angenommen werden konnte, wurde im folgenden von keiner Normalverteilung ausgegangen.

Anhand des nichtparametrischen Tests nach Kruskal-Wallis erfolgte eine Rangvarianzanalyse. Es wurden jeweils die mittleren Ränge der 3 Gruppen für die einzelnen Parameter ermittelt. Diese geben den Rang an, den die Werte der entsprechenden Gruppe im Mittel unter den Werten aller Patienten einnehmen.

Aufgrund deutlicher Hinweise für Unterschiede in den Gruppen wurde dieses auch für die Subgruppen (Kontrolle, CPH, CAH, Zirrhose/Child A, B und C) durchgeführt.

Für die Fibrosemarker und die ALT erfolgte, nach Gruppen getrennt, die Berechnung von Mittelwert, Median und Varianz.

Die Vergleiche der Gruppen und Subgruppen wurden für die einzelnen Parameter graphisch durch Darstellung des Medians und der Quartile in Form von Box-Plots gezeigt (s. Abb. 3).

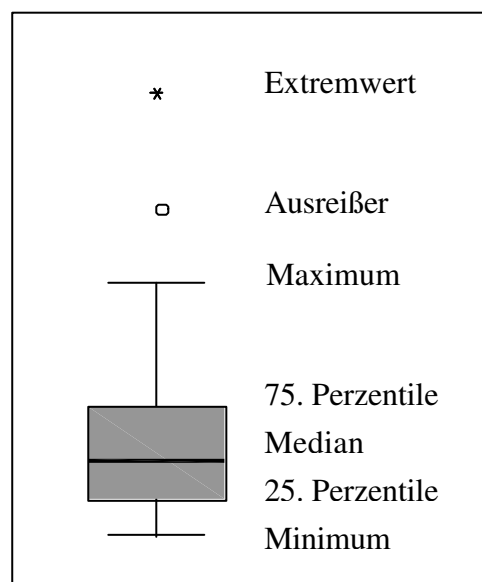


Abb. 3: Der Median wird durch eine schwarze Linie dargestellt. Jeweils ober- und unterhalb des Medians zeigen die Boxen die Quartile, also den Bereich, in dem jeweils 25% der Werte liegen. Außerhalb der Boxen führen Striche jeweils nach oben und unten. Die Balken am Ende der Striche geben den Maximal- bzw. Minimalwert an, der noch innerhalb der 1,5fachen Boxlänge liegt. Die Werte außerhalb dieses Bereichs werden Ausreißer (1,5-3fache Boxlänge) oder Extremwerte (mehr als 3fache Boxlänge) genannt.

Bei der semiquantitativen farbkodierten Duplexsonographie der Lebervenen wurden die Gruppenvergleiche graphisch anhand von Säulendiagrammen dargestellt. Dabei wurde die prozentuale Häufigkeit der verschiedenen Flußprofile für die Gruppen/Subgruppen angegeben.

Zum Vergleich der Fibrosemarker untereinander, der Fibrosemarker mit der semiquantitativen Duplexsonographie der Lebervenen und mit den klinisch-chemischen Labor-markern der Entzündungsaktivität und der Synthesefunktion der Leber wurde der Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman bestimmt. Zur Berechnung der Korrelationen zwischen den Fibrosemarkern und der FKDS wurden dabei den Flußprofilen die Zahlen 1-4 zugeordnet. Es wurde HV 0 = 1, HV 1a = 2, HV 1b = 3 und HV 2 = 4 gesetzt.

Zur Darstellung der Verlaufsbeobachtungen wurden aus den Werten für die einzelnen Vorstellungstermine der Patienten für jeden Fibrosemarker die Mediane und Quartile graphisch in Form von Box-Plots dargestellt. Dieses wurde zunächst für alle Patienten mit chronischer Hepatitis C und Leberzirrhose durchgeführt, dann gesondert für die Patienten mit Hepatitis C, bei denen zwischen mit Interferon behandelten und nicht behandelten Patienten unterschieden wurde.

Die Verläufe der farbkodierten Duplexsonographie wurden, wie oben beschrieben, durch Säulendiagramme mit Darstellung der prozentualen Häufigkeiten der einzelnen Flußprofile zum Zeitpunkt 1 und 2 gezeigt.

Abschließend wurden Langzeitverläufe der Fibrosemarker einzelner Patienten graphisch dargestellt.

Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Computerprogramme SPSS, Version 9.0, und Excel, Version 5.0.

III. Ergebnisse

III.1. Anamnese

III.1.1. Patienten mit chronischer Hepatitis C

Symptome

Bei 10 der 22 Patienten mit chronischer Hepatitis C (45%), bei denen ein Anamnesebogen vorliegt, standen unspezifische Symptome wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit und mangelnde Leistungsfähigkeit im Vordergrund. Fünf Patienten (23%) beobachteten im Verlauf der Erkrankung das Auftreten eines Ikterus, entweder anhand einer Gelbfärbung der Skleren oder einer Dunkelfärbung des Urins, die teilweise mit einer Entfärbung des Stuhls einherging. Ebenfalls 5 Patienten klagten über einen Druckschmerz im Bereich des rechten Oberbauches. Bei 3 Patienten kam es zu gastrointestinalen Beschwerden wie Diarrhoen und Übelkeit. Beschwerdefrei blieben 4 Patienten (18%).

Infektionsquelle

Die Infektionsquellen der 59 Patienten mit chronischer Hepatitis C sind in Tabelle 2 dargestellt. Dabei wurden die Risikofaktoren zugrundegelegt, die am wahrscheinlichsten Ursache der Infektion waren, da die Zuordnung nicht immer eindeutig zu treffen ist.

Bei einem Patienten kamen sowohl ein intravenöser Drogenabusus als auch eine Bluttransfusion als Infektionsquelle in Betracht. Dieser Patient wurde der ersteren Gruppe zugeordnet, da der Drogenabusus zeitlich früher stattfand und eine höhere Infektionswahrscheinlichkeit in sich birgt.

Bei einer Patientin war als einziger Risikofaktor Geschlechtsverkehr mit einem infizierten Partner zu eruieren. Obwohl die Übertragung des Hepatitis C Virus auf diesem Wege nicht gesichert ist, wird hier von dieser Infektionsquelle ausgegangen.

Auffällig ist auch eine mit 24% hohe Anzahl an Patienten, bei denen die Infektionsquelle unbekannt ist. Man spricht hier von einer sporadischen Infektion.

Tab. 2: Infektionsquellen bei 59 Patienten mit chronischer Hepatitis C

	Anzahl	Angabe in Prozent
Bluttransfusionen	17	29%
Drogenabusus	25	42%
Nadelstichverletzung	2	3,4%
Geschlechtsverkehr	1	1,7%
Sporadisch	14	24%

Infektionsdauer

Die Infektionsdauer wurde bei bekannter Infektionsquelle näherungsweise bestimmt. Bei Infektion durch eine Blutkonserve wurde der Transfusionszeitpunkt zugrundegelegt, bei mehreren Transfusionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der erste.

Bei langjährigem intravenösen Drogenabusus als Infektionsquelle wurde dessen Beginn als Infektionszeitpunkt angenommen.

Die Infektionsdauer reichte von 1-31 Jahren, Median 13 Jahre. Im Mittel lag die Infektion 14 Jahre zurück bei einer Standardabweichung von ± 8 Jahren.

Diagnosezeitpunkt

Aufgrund der häufig nur unspezifischen Symptome oder sogar Symptomlosigkeit wurde die Diagnose im Mittel erst 11 Jahre (± 9) nach der Infektion gestellt. Es vergingen bis zu 30 Jahre bis zur Diagnosestellung bei einem Median von 10 Jahren. Als Diagnosezeitpunkt wurde nach Einführung spezifischer Tests der Zeitpunkt eines positiven Antikörpernachweises, vorher das erstmalige Auftreten erhöhter Transaminasenwerte zugrundegelegt.

In vielen Fällen handelte es sich um eine Zufallsdiagnose, bei der im Rahmen einer Routineuntersuchung erhöhte Transaminasen auffielen, die Anlaß weiterer Untersuchungen waren.

III.1.2. Patienten mit Leberzirrhose

Symptome

Auch bei den Patienten mit Leberzirrhose unterschiedlicher Ätiologie waren die unspezifischen Symptome Müdigkeit und Abgeschlagenheit ein häufig genanntes Symptom. Zehn von 15 Patienten, bei denen ein Anamnesebogen vorliegt, litten darunter (67%). Das Auftreten eines Ikterus in der Anamnese konnte bei 6 Patienten (41%) beobachtet werden. Ebenfalls 6 Patienten wiesen Leberhautzeichen auf, 4 davon Spider naevi, einer eine Bauchglatze und ein Patient ein Palmarerythem. Aszites war bei 4 Patienten nachweisbar, 2 Patienten hatten Ösophagusvarizen und ebenfalls 2 berichteten über eine verstärkte Blutungsneigung. Beschwerdefrei war nur ein Patient.

Ätiologie

Bei den 50 Patienten mit Leberzirrhose war die Erkrankung in 44% (22 Patienten) der Fälle viral bedingt. Vierzehn Patienten waren mit dem Hepatitis C Virus infiziert, wovon 2 Patienten als zusätzliche Noxe einen Alkoholabusus betrieben. Acht Patienten litten an einer chronischen Hepatitis B Infektion, einer zusätzlich an einer Hepatitis D. Unter den nicht viralen Ursachen der Leberzirrhose bildete der chronische Alkoholabusus mit 36% (18 Patienten) den größten Anteil. Bei 3 Patienten lag eine Hämochromatose zugrunde, bei einem eine Autoimmunhepatitis und bei 2 Patienten ein medikamententoxischer Leberschaden. In 4 Fällen war die Ätiologie der Leberzirrhose unbekannt.

Tab. 3: Ätiologien der Lebererkrankung bei 50 Patienten mit Leberzirrhose

Ätiologie	Anzahl
Chron. Hep. C	14
Chron. Hep. B	7
Chron. Hep. D	1
Alkoholtoxisch	18
Hämochromatose	3
Medikamententoxisch	2
Autoimmunhepatitis	1
Unbekannt	4

III.2. Vergleich der Patientengruppen

Normalverteilung

Die Testung auf Normalverteilung mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests ergab, daß die Fibrosemarker und die ALT für die Gesamtheit der Patienten nicht normalverteilt sind. Die separate Testung der 3 Gruppen (Kontrolle, Chron. Hep. C und Leberzirrhose) dagegen zeigt eine Normalverteilung aller 5 Parameter für die Kontrollgruppe. Laminin ist auch in den übrigen Gruppen normalverteilt. Für PIIINP liegt bei den Patienten mit chronischer Hepatitis C eine Normalverteilung vor, für das zelluläre Fibronectin bei den Patienten mit Leberzirrhose. Hyaluronan und die ALT sind nur in der Kontrollgruppe normalverteilt.

Die farbkodierte Duplexsonographie der Lebervenen wurde aufgrund des semiquantitativen Charakters der Methode mit nur 4 verschiedenen Flußprofilen nicht auf Normalverteilung getestet.

Rangvarianzanalyse

Da nicht bei allen Gruppen die Nullhypothese der Normalverteilung angenommen werden konnte, wurde im folgenden von keiner Normalverteilung ausgegangen und anhand des nichtparametrischen Tests nach Kruskal-Wallis eine Rangvarianzanalyse durchgeführt. Diese zeigt deutliche Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen den Gruppen für alle genannten Parameter sowie die FKDS der Lebervenen.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die nach Kruskal-Wallis berechneten mittleren Ränge. Diese geben den Rang an, den die Werte der entsprechenden Gruppe im Mittel unter den Werten aller Patienten einnehmen. Außerdem werden Mittelwert, Median und Varianz, die aus den vorliegenden Werten der einzelnen Parameter für die 3 Gruppen (Kontrollen, Patienten mit chron. Hep. C und Patienten mit Leberzirrhose) berechnet wurden, angegeben.

Insgesamt zeigt sich für die Fibrosemarker N-terminales Propeptid des Typ III Prokollagens (PIIINP), Laminin (LN), Hyaluronan (HA) und zelluläres Fibronectin (cFN) eine Zunahme der mittleren Ränge, der Mittelwerte und der Mediane von den Kontrollpersonen über die Patienten mit chronischer Hepatitis C bis zu den Patienten mit Leberzirrhose. Auch die mittleren Ränge für die FKDS nehmen in der gleichen Reihenfolge zu. Hier wurde aufgrund des semiquantitativen Charakters der Methode auf die Berechnung der Mittelwerte, Mediane und Varianzen verzichtet.

Auf die genauen Werte wird bei den Beschreibungen und graphischen Darstellungen der einzelnen Parameter eingegangen.

Da die Berechnung der mittleren Ränge in den 3 Gruppen eindeutige Unterschiede ergab, wurde diese auch für die Subgruppen durchgeführt. Es zeigen sich ebenfalls deutliche Unterschiede in den mittleren Rängen zwischen den Schweregraden der Hepatitis C (CPH und CAH) und den Stadien der Leberzirrhose (Child A, B und C). Mit zunehmender Schwere der Lebererkrankung nehmen diese für alle 4 Fibrosemarker zu. Ähnliche Ergebnisse zeigt die FKDS der Lebervenen. Hier weichen nur die Stadien A und B der Leberzirrhose nach Child von dieser Reihenfolge ab. Die Patienten im Stadium A weisen im Vergleich zu den Patienten im Stadium B einen diskret höheren mittleren Rang auf (Tab. 5).

Tab. 4: Vergleich der Fibrosemarker, der ALT und der FKDS zwischen Patienten mit chronischer Hepatitis C, Patienten mit Leberzirrhose und der Kontrollgruppe anhand der mittleren Ränge, der Mittelwerte, Mediane und Varianzen

Parameter	Gruppe	Anzahl (n)	Mittlerer Rang	Mittelwert	Median	Varianz
PIIINP	Kontrolle	15	20,9	477,8	476,0	5765,6
	Chron. Hep. C	58	50,0	674,6	653,5	37960,1
	Zirrhose	50	88,2	1153,5	1011,5	360811,0
LN	Kontrolle	5	20,0	1,7	1,8	0,9
	Chron. Hep. C	38	30,1	2,0	1,9	0,2
	Zirrhose	37	54,0	3,3	3,1	2,2
HA	Kontrolle	15	34,1	32,9	24,8	988,8
	Chron. Hep. C	59	40,5	40,4	27,8	1735,4
	Zirrhose	50	97,0	644,5	274,0	2095136,1
cFN	Kontrolle	15	27,3	645,5	620,0	74410,0
	Chron. Hep. C	59	56,1	1371,9	1025,0	1272787,5
	Zirrhose	46	77,0	2125,0	1817,0	1887166,1
ALT	Kontrolle	15	16,0	9,5	9,0	8,8
	Chron. Hep. C	59	75,8	61,5	41,0	5091,7
	Zirrhose	50	60,7	48,3	25,0	8657,9
FKDS	Kontrolle	15	31,0			
	Chron. Hep. C	39	35,1			
	Zirrhose	31	58,8			

Tab. 5: Vergleich der Fibrosemarker, der ALT und der FKDS zwischen verschiedenen Schweregraden der chronischen Hepatitis C und der Leberzirrhose anhand der mittleren Ränge

Parameter	Gruppe	Anzahl (n)	Mittlerer Rang
PIIINP	CPH	41	47,6
	CAH	17	56,0
	ZIR/Child A	21	77,0
	ZIR/Child B	15	92,8
	ZIR/Child C	14	100,2
LN	CPH	27	28,4
	CAH	11	34,2
	ZIR/Child A	18	42,4
	ZIR/Child B	10	62,4
	ZIR/Child C	9	67,7
HA	CPH	42	39,5
	CAH	17	43,1
	ZIR/Child A	21	85,6
	ZIR/Child B	15	101,6
	ZIR/Child C	14	109,1
cFN	CPH	42	52,9
	CAH	17	63,9
	ZIR/Child A	18	67,6
	ZIR/Child B	15	78,9
	ZIR/Child C	13	87,8
ALT	CPH	42	67,4
	CAH	17	96,8
	ZIR/Child A	21	61,4
	ZIR/Child B	15	66,9
	ZIR/Child C	14	52,9
FKDS	CPH	29	33,5
	CAH	10	39,7
	ZIR/Child A	14	53,2
	ZIR/Child B	8	48,3
	ZIR/Child C	9	76,8

Graphische Darstellungen

Es folgen für die einzelnen Fibrosemarker, die ALT und die FKDS der Lebervenen gesondert graphische Darstellungen der Vergleiche zwischen den Patientengruppen. Bei den Laborparametern werden die Mediane und Quartile in Form von Box-Plots dargestellt. Ausreißer und Extremwerte sind, sofern sie im angegebenen Bereich liegen, aufgeführt. Liegen sie außerhalb dieses Bereichs, sind sie aus Gründen der Übersichtlichkeit der Diagramme nicht eingezeichnet. Sie werden aber zum Teil im Text erwähnt. Bei Vorliegen von Normwerten sind diese als gestrichelte Linie dargestellt. Für die FKDS werden jeweils die prozentualen Häufigkeiten der einzelnen Flußprofile in den Gruppen/Subgruppen angegeben.

III.2.1. N-terminales Propeptid des Typ III Prokollagens (PIIINP)

Abbildung 4 zeigt deutliche Unterschiede der PIIINP-Werte für die verschiedenen Gruppen. Die die Quartile anzeigenden Boxen der Patienten mit chronischer Hepatitis C überschneiden sich nicht mit denen der Patienten mit Leberzirrhose. Während die Werte bei den Hepatitispatienten überwiegend im Normbereich liegen, wird dieser bei den Zirrhosepatienten deutlich überschritten. Die Gruppe der Patienten mit Leberzirrhose nimmt einen mittleren Rang von 88,2 ein, im Gegensatz zu den Patienten mit chronischer Hepatitis C mit 50,0 und den Kontrollpersonen mit 20,9 (Tab. 4). Die mittleren Ränge zeigen somit eine gute Abgrenzung der 3 Gruppen voneinander. Auch der Mittelwert ist bei den Patienten mit Leberzirrhose mit 1153,5 U/l fast doppelt so hoch wie bei den Patienten mit Hepatitis C mit 674,6 U/l.

Die Streuung der PIIINP-Werte ist bei den Patienten mit Leberzirrhose sehr groß im Vergleich zu den Patienten mit Hepatitis C. Bei den Kontrollpersonen ist diese am geringsten. Den höchsten PIIINP-Wert von 3340 U/l weist der Patient O. P. mit alkoholtoxischer Leberzirrhose im Stadium C nach Child auf.

In Abbildung 5 sind die Unterschiede der PIIINP-Werte für die Subgruppen dargestellt. Es zeigt sich ebenfalls eine steigende Tendenz der Werte mit zunehmender Schwere der Lebererkrankung. Während der Unterschied zwischen den Patienten mit verschiedenen Aktivitätsgraden der Leberentzündung nur sehr gering ist, wird dieser am Übergang der CAH zur Leberzirrhose deutlicher. Zum Stadium Child A der Leberzirrhose gibt es noch eine geringe Überschneidung der Boxen, welche aber zum Stadium Child B nicht mehr vorhanden ist. Außerdem zeigt sich, daß die große Streuung der Werte bei den Patienten mit Leberzirrhose vor allem auf die im Stadium Child C zurückzuführen ist.

Abb. 4: PIINP im Vergleich der Patienten mit chronischer Hepatitis C zu Patienten mit Leberzirrhose und gesunden Kontrollpersonen

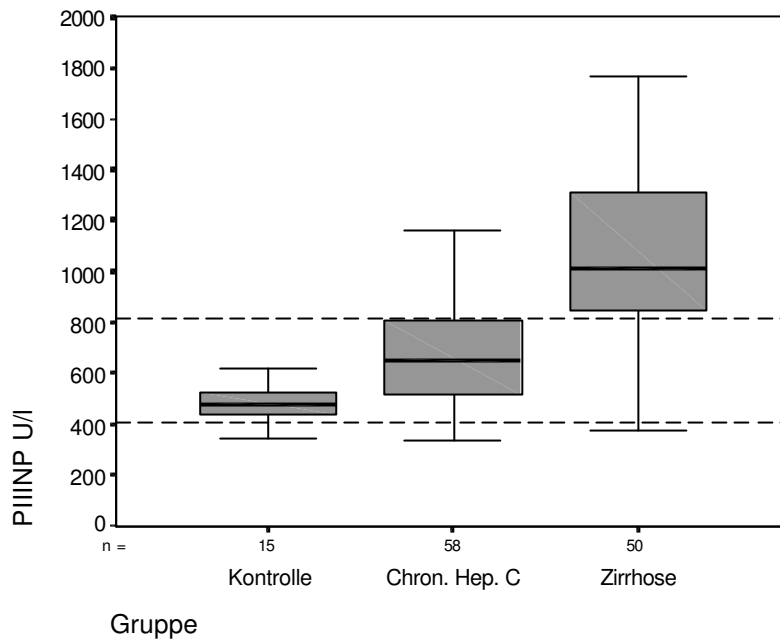
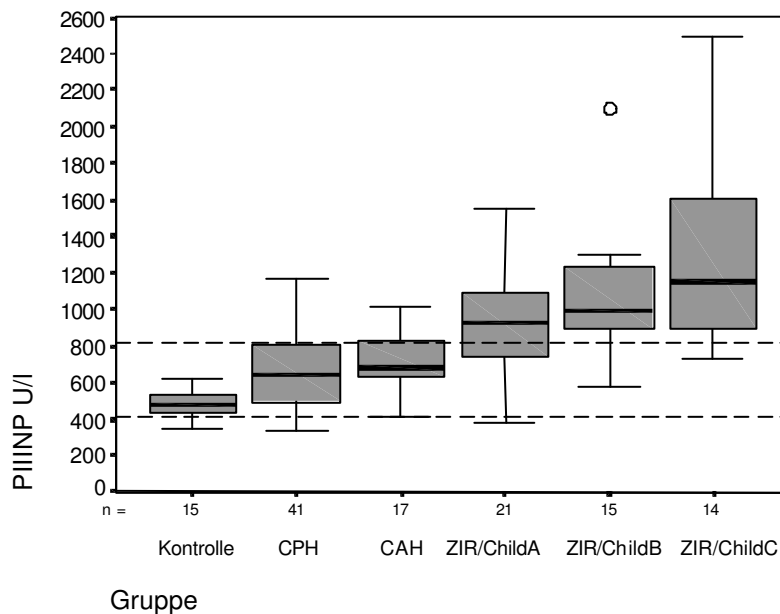


Abb. 5: PIINP im Vergleich der Subgruppen chronisch persistierende und chronisch aktive Hepatitis C, Leberzirrhose im Stadium A, B und C nach Child und gesunden Kontrollpersonen



III.2.2 Laminin (LN)

Wie Abbildung 6 zeigt, gibt es auch bei den Lamininwerten deutliche Unterschiede zwischen den Patientengruppen, allerdings sind die Überschneidungen größer als beim PIIINP. Während die Werte fast aller Kontrollpersonen im definierten Normbereich liegen, wird dieser von der Hälfte der Patienten mit chronischer Hepatitis C überschritten. Bei den Patienten mit Leberzirrhose liegt nur noch ein zu vernachlässigender Anteil innerhalb dieses Bereiches. Die mittleren Ränge der Kontrollpersonen (20,0) und der Patienten mit Hepatitis C (30,1) unterscheiden sich nur geringfügig. Dagegen nehmen die Patienten mit Leberzirrhose einen mittleren Rang von 54,0 ein und lassen sich somit deutlich von den beiden anderen Gruppen abgrenzen (Tab. 4).

Wie schon beim PIIINP zu beobachten war, weist die Gruppe der Patienten mit Leberzirrhose auch für Laminin die größte Streuung auf. Der Patient O. P. mit alkoholtoxischer Leberzirrhose im Stadium Child C liegt auch hier mit einem Wert von 8,8 kU/l außerhalb des angegebenen Bereiches.

In Abbildung 7 sind die Vergleiche der Laminin-Werte für die Subgruppen dargestellt. Es zeigt sich ebenfalls eine steigende Tendenz der mittleren Ränge und Mediane mit zunehmender Schwere der Lebererkrankung. Die beste Unterscheidung anhand des Laminins gelingt zwischen den Patienten mit Leberzirrhose im Stadium Child A und B. Bei den übrigen Subgruppen gibt es sehr große Überschneidungen. Am deutlichsten wird dieses bei den Stadien Child B und C der Leberzirrhose. Die Quartile der Patienten im Stadium C liegen innerhalb der oberen Quartile der Patienten im Stadium B, welche eine sehr breite Streuung zeigen.

Abb. 6: Laminin im Vergleich der Patienten mit chronischer Hepatitis C zu Patienten mit Leberzirrhose und gesunden Kontrollpersonen

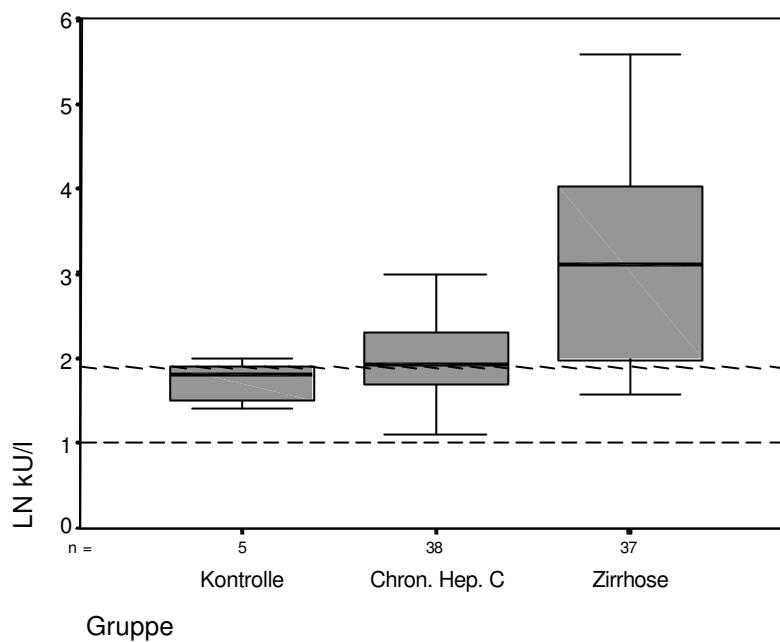
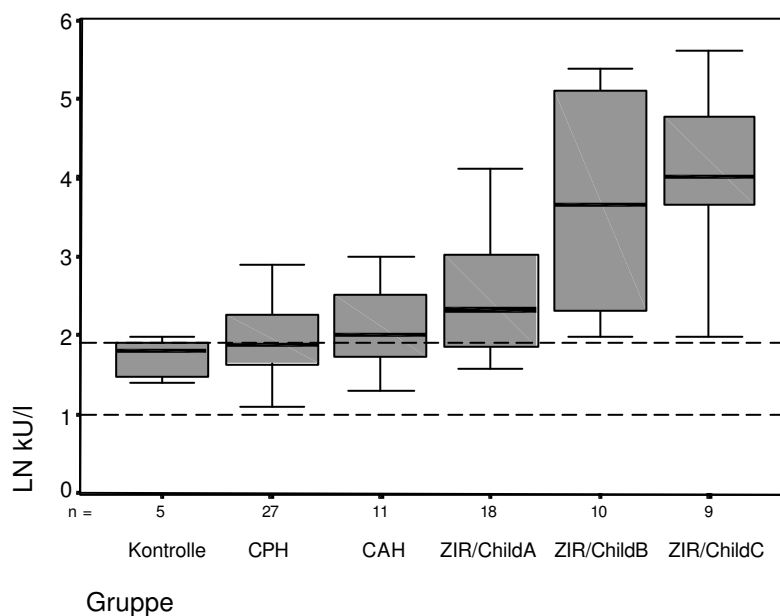


Abb. 7: Laminin im Vergleich der Subgruppen chronisch persistierende und chronisch aktive Hepatitis C, Leberzirrhose im Stadium A, B und C nach Child und gesunden Kontrollpersonen



III.2.3. Hyaluronan (HA)

Die beste Unterscheidung zwischen Patienten mit chronischer Hepatitis C und Patienten mit Leberzirrhose gelingt anhand des Hyaluronans (Abb. 8). Während die Patienten mit chronischer Hepatitis C einen mittleren Rang von 40,5 einnehmen, liegt dieser bei den Patienten mit Leberzirrhose bei 97,0. Der Mittelwert ist bei Vorliegen einer Leberzirrhose um den Faktor 16 höher als bei chron. Hep. C (32,9 bei chron Hep. C gegenüber 644,5 bei Zirrhose) (Tab. 4). Dagegen unterscheiden sich die Werte der Patienten mit Hepatitis C kaum von denen der Kontrollpersonen. Sie liegen sogar bis auf wenige Ausreißer im Normbereich.

Bei den Patienten mit Leberzirrhose ist auch für das Hyaluronan eine breite Streuung zu verzeichnen. Patient O. P. im Stadium Child C überschreitet mit 10.000 µg/l den angegebenen Bereich sogar um ein Vielfaches.

Abbildung 9 zeigt die Verteilung der Werte für Hyaluronan in den Subgruppen. Die Grenze zwischen CAH und Zirrhose im Stadium Child A stellt sich scharf dar. Während die Patienten mit CAH einen mittleren Rang von 43,1 aufweisen, liegt dieser bei letzterer Gruppe schon bei 85,6 (Tab. 5). Im Gegensatz zu den Patienten im Stadium A zeigen die Patienten in den Stadien B und C eine breite Streuung und überschneiden sich überwiegend.

Abb. 8: Hyaluronan im Vergleich der Patienten mit chronischer Hepatitis C zu Patienten mit Leberzirrhose und gesunden Kontrollpersonen

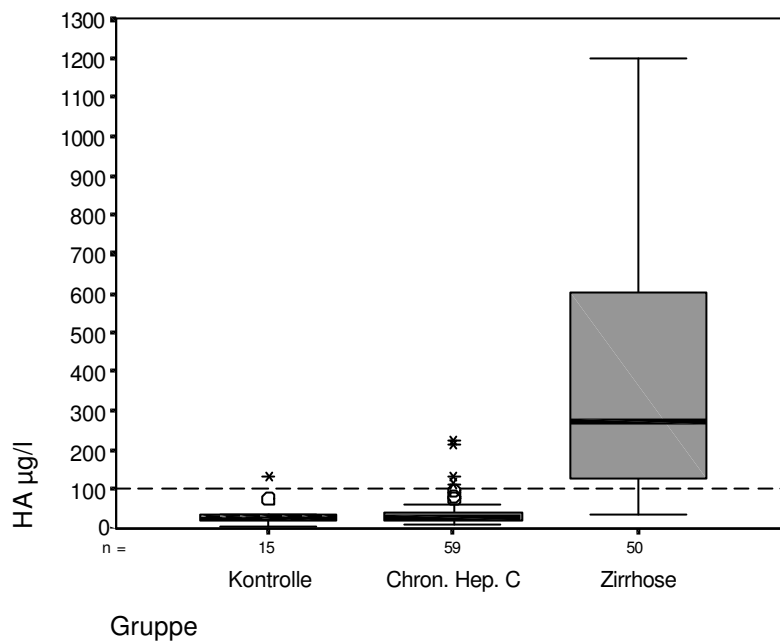
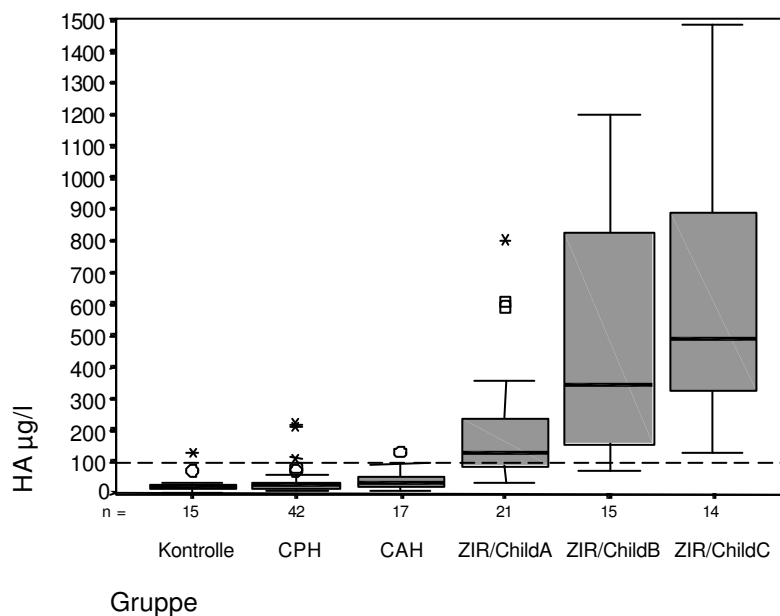


Abb. 9: Hyaluronan im Vergleich der Subgruppen chronisch persistierende und chronisch aktive Hepatitis C, Leberzirrhose im Stadium A, B und C nach Child und gesunden Kontrollpersonen



III.2.4. Zelluläres Fibronectin (cFN)

Die Werte für das zelluläre Fibronectin zeigen deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen, allerdings mit großen Überschneidungen (Abb. 10). In der Abbildung ist zu erkennen, daß sich die Werte etwa der Hälfte der Patienten jeweils mit denen der benachbarten Gruppe überschneiden. Dennoch nehmen die mittleren Ränge von den Kontrollpersonen (27,3) über die Patienten mit chronischer Hepatitis C (56,1) bis zu den Patienten mit Leberzirrhose (77,0) deutlich zu (Tab. 4).

Die Verteilung in den Subgruppen stellt sich ähnlich dar (Abb. 11). Die mittleren Ränge (Tab. 5) und die Mediane nehmen mit zunehmender Schwere der Lebererkrankung zwar zu, allerdings zeigen sich auch hier große Überschneidungen. Anhand des zellulären Fibronectins gelingt keine klare Unterscheidung zwischen den Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis C und denen mit Leberzirrhose im Stadium Child A. Der mittlere Rang steigt nur von 63,9 bei CAH auf 67,6 bei Zirrhose Child A an.

Für das zelluläre Fibronectin ist im Gegensatz zu den übrigen Laborparametern kein Normbereich eingezeichnet, da dieser hierfür noch nicht definiert wurde.

III.2.5. Alaninaminotransferase (ALT)

Die Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen wurden ebenfalls für die Alaninaminotransferase dargestellt (Abb. 12). Bei diesem Enzym, das zu den Transaminasen gehört, handelt es sich um einen Marker der Entzündungsaktivität der Leber. Die Werte liegen bei den Kontrollpersonen im Normbereich und sind bei den Hepatitispatienten deutlich erhöht. Allerdings weist auch ein kleiner Teil der Patienten mit chronischer Hepatitis C normale ALT-Werte auf. Bei den Patienten mit Leberzirrhose sinken die Werte im Mittel wieder ab, was die nachlassende Entzündungsaktivität oder die Rarefizierung des funktionsfähigen Leberparenchyms anzeigt.

Abbildung 13 zeigt die Verteilung in den Subgruppen. Hier findet sich ein ähnliches Bild. Die Werte steigen mit zunehmender Entzündungsaktivität. Sie sind am höchsten bei den Patienten mit CAH und fallen bereits im Stadium Child A der Leberzirrhose deutlich ab.

Vier Patienten liegen mit ihren Werten oberhalb des angegebenen Bereichs. Patient K. B. mit Leberzirrhose unbekannter Ätiologie im Stadium Child B weist mit 642 U/l den höchsten Wert auf.

Abb. 10: Zelluläres Fibronektin im Vergleich der Patienten mit chronischer Hepatitis C zu Patienten mit Leberzirrhose und gesunden Kontrollpersonen

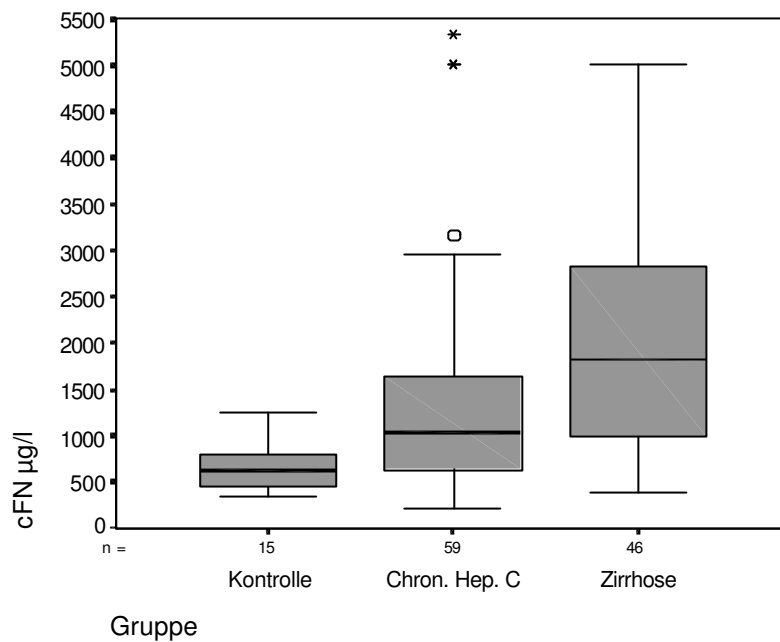


Abb. 11: Zelluläres Fibronektin im Vergleich der Subgruppen chronisch persistierende und chronisch aktive Hepatitis C, Leberzirrhose im Stadium A, B und C nach Child und gesunden Kontrollpersonen

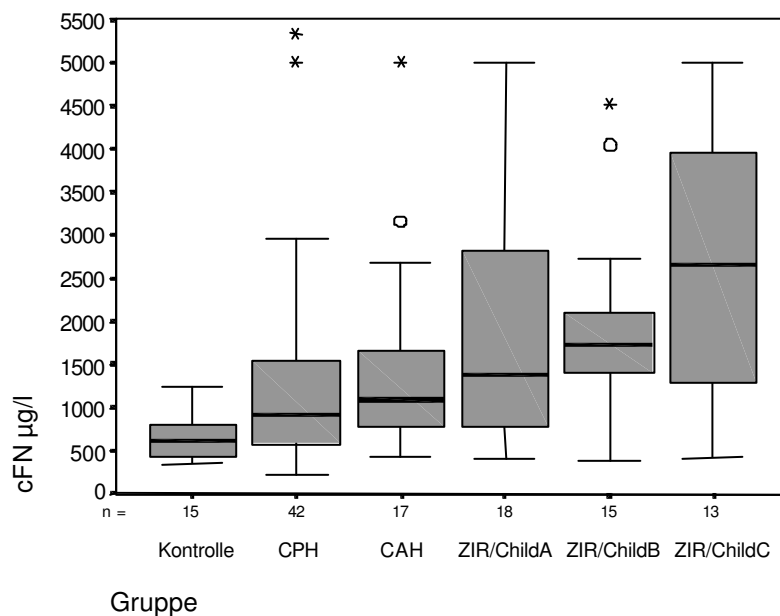


Abb. 12: ALT im Vergleich der Patienten mit chronischer Hepatitis C zu Patienten mit Leberzirrhose und gesunden Kontrollpersonen

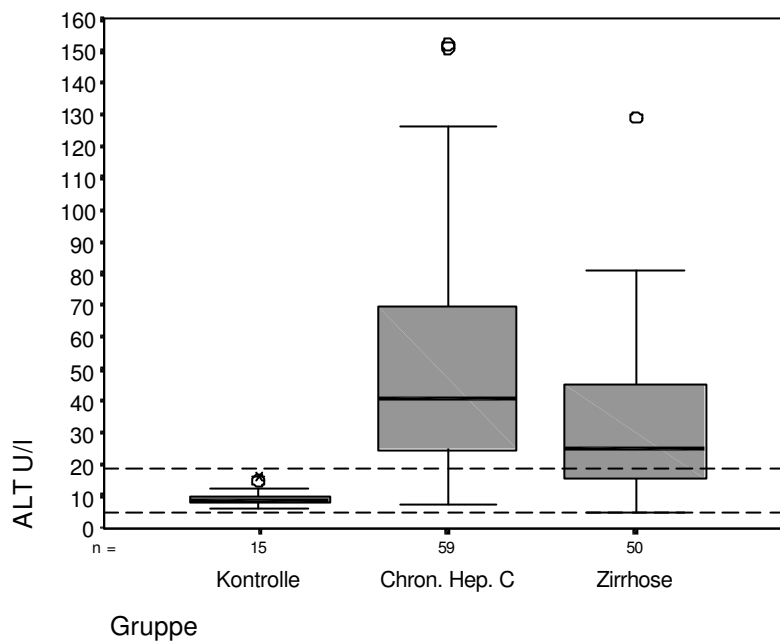
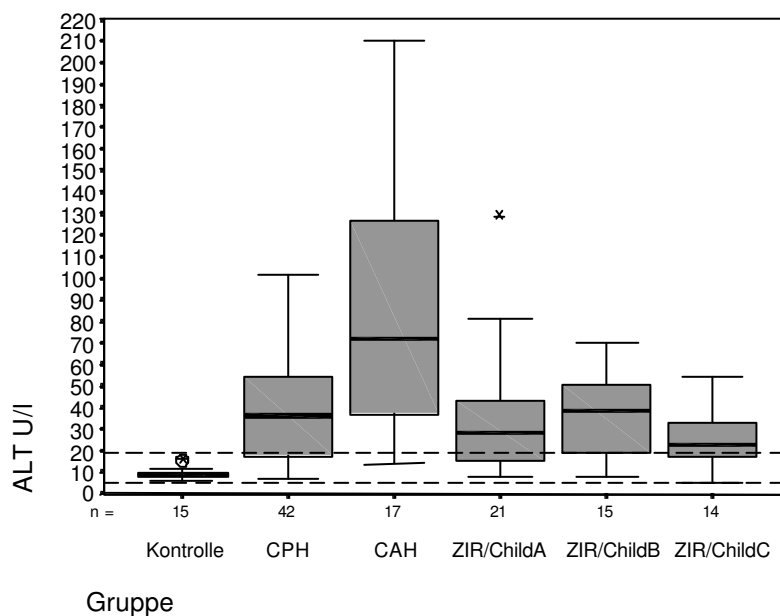


Abb. 13: ALT im Vergleich der Subgruppen chronisch persistierende und chronisch aktive Hepatitis C, Leberzirrhose im Stadium A, B und C nach Child und gesunden Kontrollpersonen



III.2.6. Farbkodierte Duplexsonographie (FKDS) der Lebervenen

Für die farbkodierte Duplexsonographie der Lebervenen sind die prozentualen Häufigkeiten der jeweiligen Lebervenen-Flußprofile als Säulen dargestellt (Abb. 14). Es zeigt sich bei allen 15 Kontrollpersonen ein normales triphasisches Flußprofil. Von den 39 untersuchten Patienten mit chronischer Hepatitis C weisen 35 ebenfalls einen triphasischen Fluß auf. Bei 3 Patienten ist ein biphasischer (HV 1a) und bei einem sogar ein flacher Fluß (HV 2) nachweisbar. In der Gruppe der Patienten mit Leberzirrhose dagegen kommt nur noch in 35% der 31 untersuchten Patienten ein normales triphasisches Lebervenen-Flußprofil vor. Acht Patienten zeigen einen biphasischen (HV 1a), 5 einen leicht gewellten (HV 1b) und 7 einen flachen Fluß (HV 2). Auch die mittleren Ränge spiegeln die Unterschiede zwischen den Gruppen wider (Tab. 4). Während die Patienten mit chronischer Hepatitis C sich mit einem mittleren Rang von 35,1 nur leicht von den Kontrollpersonen (31,0) unterscheiden, nehmen die Patienten mit Leberzirrhose einen mittleren Rang von 58,8 ein.

Abbildung 15 zeigt die Häufigkeiten der einzelnen Flußprofile in den Untergruppen. Von den 29 untersuchten Patienten mit CPH weisen bis auf 2 Patienten mit biphasischem Fluß (HV 1a) alle anderen Patienten ein normales Flußprofil auf. Einer der 10 untersuchten Patienten mit CAH zeigt einen flachen Fluß der Lebervenen (HV 2) und einer einen biphasischen (HV 1a). Bei den übrigen 8 Patienten liegt ein triphasischer Fluß vor. Deutliche Unterschiede zeigt der Übergang zur Leberzirrhose im Stadium Child A. In dieser Gruppe weisen nur noch 43%, also 6 der 14 untersuchten Patienten einen normalen Fluß auf. Bei weiteren 6 Patienten ist das Flußprofil HV 1a, bei einem HV 1b und bei einem anderen Patienten HV 2 nachweisbar. Von den 8 untersuchten Patienten im Stadium Child B ist bei 5 Patienten ein normales triphasisches Flußprofil nachweisbar, 2 Patienten weisen einen nur noch leicht gewellten, einer einen komplett flachen Fluß auf. Im Stadium Child C der Leberzirrhose zeigt keiner der 9 Patienten mehr einen normalen triphasischen Fluß. Während jeweils 2 Patienten das Profil HV 1a und HV 1b aufweisen, findet sich bei 5 Patienten ein völlig abgeflachter Lebervenenfluß (HV 2). Die in Tabelle 4 aufgeführten mittleren Ränge unterstreichen diese Beobachtungen.

Abb. 14: FKDS im Vergleich der Patienten mit chronischer Hepatitis C zu Patienten mit Leberzirrhose und gesunden Kontrollpersonen

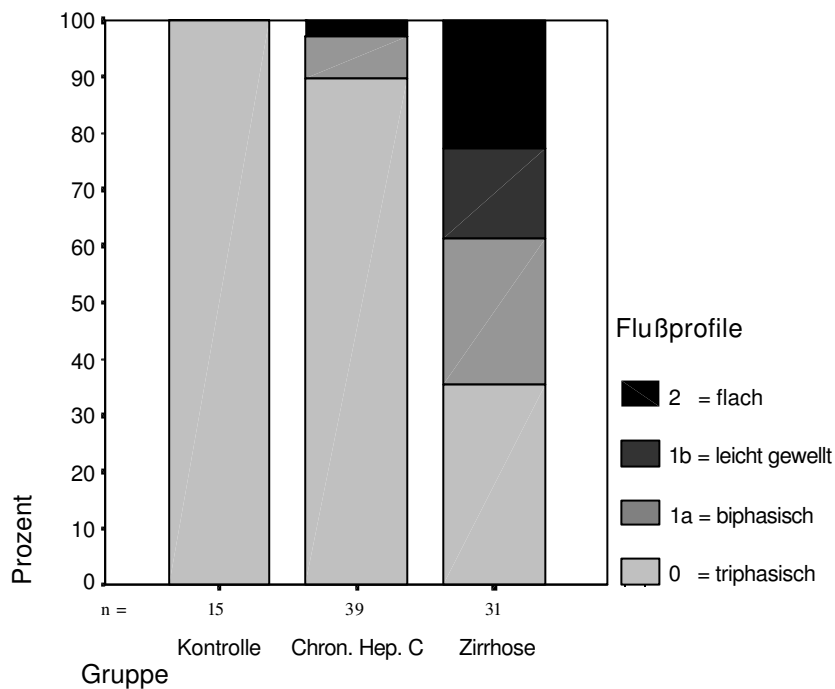
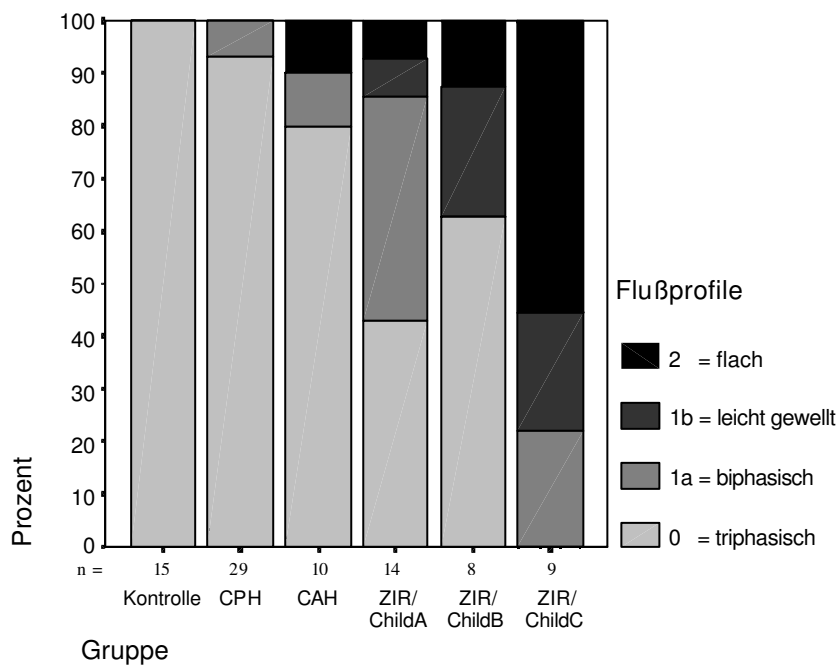


Abb. 15: FKDS im Vergleich der Subgruppen chronisch persistierende und chronisch aktive Hepatitis C, Leberzirrhose im Stadium A, B und C nach Child und gesunden Kontrollpersonen



III.3. Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern

III.3.1. Korrelationen der Fibrosemarker untereinander

Die Fibrosemarker wurden für die 3 Gruppen (Kontrollen, chron. Hep. C und Zirrhose) zusammen auf Korrelationen untereinander untersucht. Dabei wurden der Korrelationskoeffizient nach Spearman und die 2-seitige Signifikanz berechnet.

Wie Tabelle 5 zeigt, korrelieren alle 4 Fibrosemarker miteinander ($p < 0,001$). Am deutlichsten ist dieses zwischen PIIINP und Hyaluronan mit einem Korrelationskoeffizienten (r) von 0,635, gefolgt von Laminin und Hyaluronan mit einem Koeffizienten von 0,562 und PIIINP und Laminin ($r = 0,545$). Das zelluläre Fibronectin läßt ebenfalls eine, wenn auch etwas schwächere, Korrelation zu den übrigen Fibrosemarkern erkennen ($r > 0,45$).

Tab. 6: Korrelationen der Fibrosemarker untereinander

		PIIINP	LN	HA	cFN
PIIINP	Koeffizient nach Spearman		0,545	0,635	0,472
	Signifikanz (2-seitig)		< 0,001	< 0,001	< 0,001
	n	123	80	123	119
LN	Koeffizient nach Spearman	0,545		0,562	0,471
	Signifikanz (2-seitig)	< 0,001		< 0,001	< 0,001
	n	80	80	80	77
HA	Koeffizient nach Spearman	0,635	0,562		0,453
	Signifikanz (2-seitig)	< 0,001	< 0,001		< 0,001
	n	123	80	124	120
cFN	Koeffizient nach Spearman	0,472	0,471	0,453	
	Signifikanz (2-seitig)	< 0,001	< 0,001	< 0,001	
	n	119	77	120	120

III.3.2. Korrelationen der Fibrosemarker mit der FKDS

Die Zusammenhänge zwischen FKDS und Fibrosemarkern wurden ebenfalls anhand der nichtparametrischen Korrelation nach Spearman untersucht (Tab. 7). Für die Berechnung wurden den Flußprofilen die Zahlen 1-4 gegeben (s.o.).

Auch hier zeigen sich deutliche Korrelationen ($p < 0,001$). Am ausgeprägtesten ist der Zusammenhang zwischen der FKDS und Hyaluronan bzw. Laminin ($r > 0,6$). Aber auch PIIINP und das zelluläre Fibronectin korrelieren deutlich mit einem Korrelationskoeffizienten $> 0,5$ mit der FKDS.

Tab. 7: Korrelationen der Fibrosemarker mit der FKDS

		PIIINP	LN	HA	cFN
FKDS	Koeffizient nach Spearman	0,532	0,602	0,609	0,512
	Signifikanz (2-seitig)	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$
	n	84	52	85	83

III.3.3. Korrelationen der Fibrosemarker mit Routinelaborparametern

Es wurden außerdem die Korrelationen der Fibrosemarker mit Routinelabormarkern der Entzündungsaktivität und Synthesefunktion der Leber untersucht (Tab. 8). Im Text werden die Parameter erwähnt, die einen Korrelationskoeffizienten $> 0,5$ mit einem $p < 0,001$ aufweisen. Zusätzlich wird auf den Zusammenhang der Fibrosemarker mit den Transaminasen Alaninaminotransferase (ALT) und Aspartataminotransferase (AST) eingegangen.

Es besteht eine inverse Korrelation zwischen Albumin (Alb) und allen 4 Fibrosemarkern mit $p < 0,001$, wobei sich mit Hyaluronan die beste Korrelation mit einem Koeffizienten von $-0,668$ findet. PIIINP und Laminin weisen mit Albumin ebenfalls einen Korrelationskoeffizienten $< -0,5$ auf.

Auch die Alkalische Phosphatase (AP) korreliert mit allen Fibrosemarkern ($p < 0,001$), am deutlichsten mit Hyaluronan ($r = 0,655$) und Laminin ($r = 0,535$).

Zwischen der Gammaglutamyltranspeptidase (γ GT) und Hyaluronan besteht ein deutlicher Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizienten von $0,54$. Die übrigen Fibrosemarker korrelieren ebenfalls mit der γ GT ($p < 0,001$).

Für die Pseudocholinesterase (PCHE) besteht eine inverse Korrelation mit Laminin ($r = -0,556$) und Hyaluronan ($r = -0,640$). PIINP und das zelluläre Fibronectin zeigen einen etwas schwächeren Zusammenhang zur PCHE.

Gesamtbilirubin (T-Bili) korreliert am deutlichsten mit Laminin und Hyaluronan ($r = 0,532$ bzw. $0,599$).

Zwischen Quickwert und PIINP bzw. Hyaluronan besteht ein negativer Zusammenhang mit $r = -0,579$ bzw. $-0,597$.

Die Partielle Thromboplastinzeit (PTT) zeigt eine schwächere Korrelation mit den Fibrosemarkern als die zuvor genannten Parameter.

Der schwächste Zusammenhang besteht zwischen den Fibrosemarkern und der Alaninaminotransferase (ALT). Dieser Marker der Entzündungsaktivität korreliert nur mit dem zellulären Fibronectin mit $p = 0,002$ und $r = 0,274$. Für die übrigen Fibrosemarker ist $p > 0,2$. Die Aspartataminotransferase (AST) dagegen korreliert mit allen 4 Fibrosemarkern mit $p < 0,001$. Die Korrelationskoeffizienten sind allerdings $< 0,5$.

Insgesamt besteht unter den Fibrosemarkern die deutlichste Korrelation zu den Routine-laborparametern beim Hyaluronan. Hierbei zeigt sich vor allem ein inverser Zusammenhang zu den Parametern, die die Synthesefunktion der Leber darstellen, im Gegensatz zu den Markern der Entzündungsaktivität.

Tab. 8: Korrelationen der Fibrosemarker mit Routinelaborparametern

		Alb	AP	γGT	PCHE	T-Bili	Quick	PTT	AST	ALT
PIIINP	Koeffizient nach Spearman	-0,517	0,472	0,483	-0,483	0,438	-0,579	0,419	0,388	0,115
	Signifikanz (2-seitig)	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,205
	n	123	123	123	123	123	93	93	123	123
LN	Koeffizient nach Spearman	-0,557	0,535	0,435	-0,556	0,532	-0,450	0,350	0,460	0,089
	Signifikanz (2-seitig)	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,006	< 0,001	0,435
	n	80	80	80	80	80	61	61	80	80
HA	Koeffizient nach Spearman	-0,668	0,655	0,540	-0,640	0,599	-0,597	0,380	0,487	0,107
	Signifikanz (2-seitig)	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,237
	n	124	124	124	124	124	94	94	124	124
cFN	Koeffizient nach Spearman	-0,376	0,488	0,437	-0,264	0,285	-0,316	0,091	0,452	0,274
	Signifikanz (2-seitig)	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,004	0,002	0,002	0,389	< 0,001	0,002
	n	120	120	120	120	120	92	92	120	120

III.4. Verlaufsbeobachtungen

Ein Teil der Patienten mit chronischer Hepatitis C und der Patienten mit Leberzirrhose stellte sich mindestens dreimal zur Verlaufskontrolle der Fibrosemarker und der Routinelabormarker der Entzündungsaktivität und Synthesefunktion der Leber vor. Der Verlauf wird graphisch anhand der Mediane und Quartile in Form von Box-Plots an den 3 Vorstellungsterminen zum Zeitpunkt 0, nach 1-3 Monaten und nach 3-12 Monaten dargestellt. Bei einer kleineren Gruppe von 18 Patienten erfolgten monatliche Verlaufskontrollen über den Zeitraum von 3 Monaten.

Der zeitliche Verlauf wurde sowohl für alle Patienten als Gesamtheit als auch für die Gruppe der Patienten mit chronischer Hepatitis C, getrennt nach behandelten und unbehandelten Patienten, untersucht. Exemplarisch werden für letztere Gruppe nur Abbildungen von PIIINP und Hyaluronan gezeigt.

Die Farbdoppleruntersuchungen wurden zweimal im Abstand von 3-10 Monaten durchgeführt. Sie werden durch Säulendiagramme mit Angabe der prozentualen Häufigkeiten der jeweiligen Flußprofile der Lebervenen an den 2 Terminen dargestellt.

III.4.1. N-terminales Propeptid des Typ III Prokollagens (PIIINP)

Abbildung 16 zeigt den zeitlichen Verlauf von PIIINP über einen Zeitraum von bis zu 12 Monaten. Es kommt zu einer leichten Abnahme des Medians zu jedem Kontrolltermin. Der Mittelwert dagegen steigt von 845 U/l am 1. Termin auf 1545 U/l am Untersuchungszeitpunkt 2, um dann wieder auf 668 U/l am Termin 3 abzufallen. Es sind große Überschneidungen der Quartile zu den 3 Untersuchungszeitpunkten und weite Streuungen zu beobachten. Außerdem ist die Schwankungsbreite der Werte sehr groß, so daß von keinen aussagekräftigen Veränderungen der PIIINP-Werte über den untersuchten Zeitraum ausgegangen werden kann.

In Abbildung 17 ist der Verlauf regelmäßiger monatlicher Kontrollen bei 18 Patienten über 3 Monate dargestellt. Über diesen Zeitraum sind insgesamt ebenfalls keine eindeutigen Veränderungen in den Werten erkennbar.

Die Abbildungen 18 und 19 zeigen die Verteilung der Werte gesondert für behandelte und unbehandelte Patienten mit chronischer Hepatitis C über den Verlauf von bis zu 12 Monaten. Sowohl in der Gruppe der unbehandelten als auch der mit Interferon behandelten Patienten kommt es zum leichten Rückgang der Mediane. Während in der Gruppe der unbehandelten Patienten auch die Mittelwerte im Verlauf abnehmen, steigt bei den mit Interferon behandelten Patienten der Mittelwert von 821 U/l am Zeitpunkt 1

auf 1325 U/l am Zeitpunkt 2 an. Zum Termin 3 kommt es dagegen wieder zu einem Abfall auf 640 U/l. Dieses zeigt die große Schwankungsbreite der Werte. Außerdem ist bei den mit Interferon behandelten Patienten kein deutlicherer Rückgang der Werte im Vergleich zu den unbehandelten Patienten erkennbar.

III.4.2. Laminin (LN)

Wie die Abbildungen 20 und 21 zeigen, bleiben die Lamininwerte sowohl über den Zeitraum von bis zu 12 Monaten (Abb. 20) als auch über den kürzeren Verlauf von 3 Monaten (Abb. 21) bis auf leichte Schwankungen konstant. Im Gegensatz zum PIIINP ist eine diskrete Erhöhung der Werte erkennbar. Im Verlauf von bis zu 12 Monaten steigt der Mittelwert bei fast konstantem Median von 1,8 kU/l auf 2,37 kU/l an. Die über 3 Monate beobachteten Patienten zeigen dagegen fast konstante Mittelwerte.

Auch bei der gesonderten Untersuchung des Verlaufs der Patienten mit chronischer Hepatitis C (nicht abgebildet) ist eine diskrete Steigerung der Lamininwerte erkennbar, wobei keine eindeutigen Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Patienten zu beobachten sind.

Die Verlaufswerte von Laminin sind allerdings nur sehr vorsichtig zu interpretieren, da es im Verlauf Probleme mit der Genauigkeit des Assays gab. Aus diesem Grund konnten am Ende der Studie keine Lamininbestimmungen mehr durchgeführt werden. Zum Untersuchungszeitpunkt 3, also nach 3–12 Monaten, liegen nur noch für 12 Patienten Werte vor.

Abb. 16: PIIINP im Verlauf an 3 Untersuchungszeitpunkten über einen Zeitraum von bis zu 12 Monaten bei Patienten mit chronischer Hepatitis C und Patienten mit Leberzirrhose

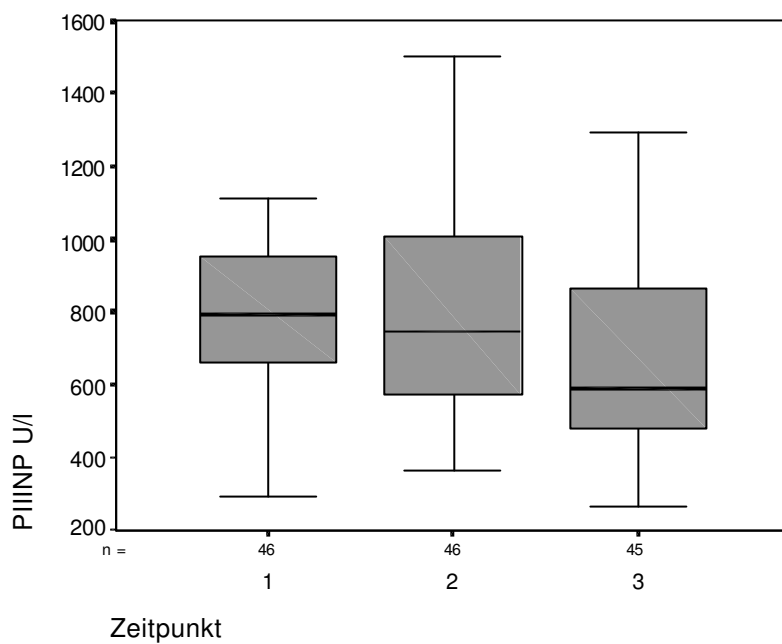


Abb. 17: PIIINP in monatlichen Verlaufskontrollen über 3 Monate bei Patienten mit chronischer Hepatitis C und Patienten mit Leberzirrhose

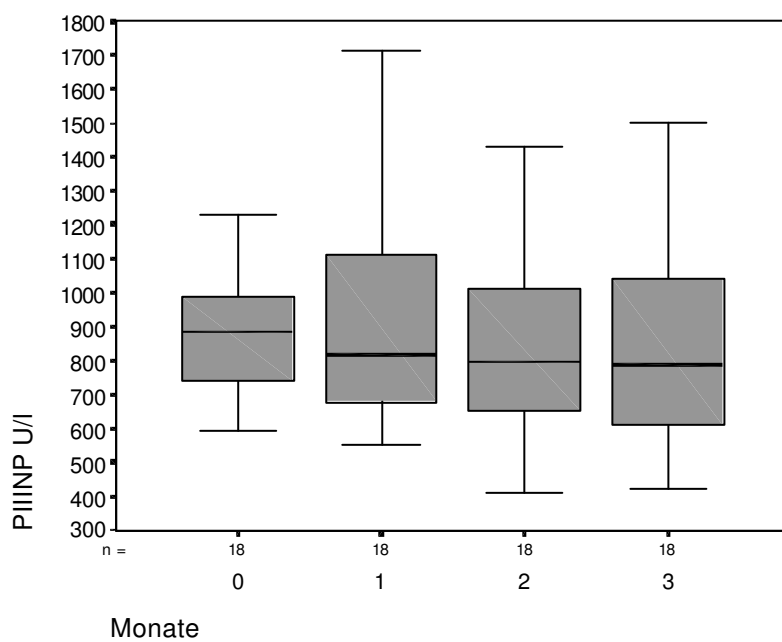


Abb. 18: PIINP im Verlauf an 3 Untersuchungszeitpunkten über einen Zeitraum von bis zu 12 Monaten bei unbehandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C

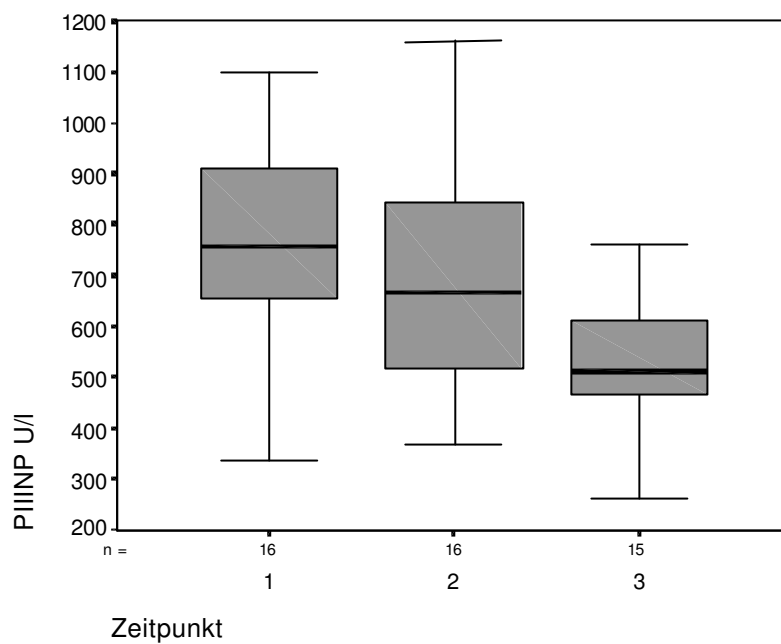


Abb. 19: PIINP im Verlauf an 3 Untersuchungszeitpunkten über einen Zeitraum von bis zu 12 Monaten bei Patienten mit chronischer Hepatitis C unter Interferonbehandlung

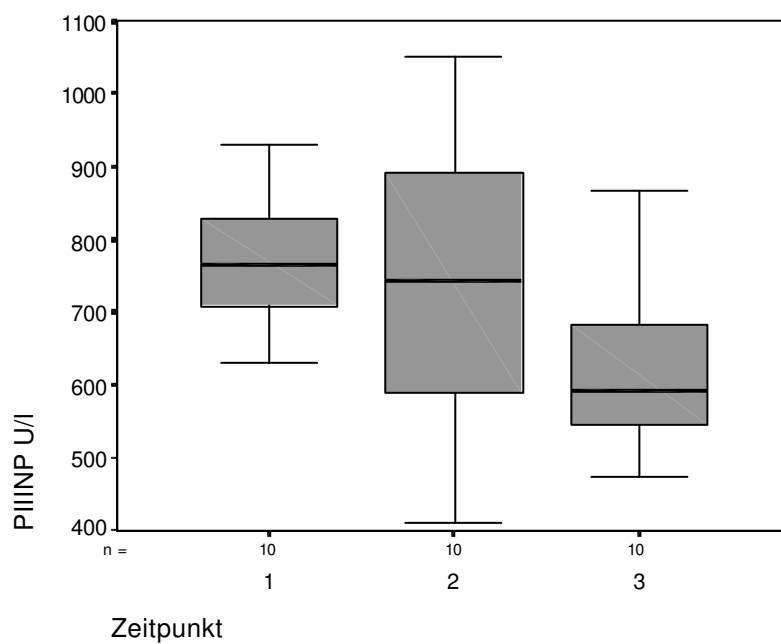


Abb. 20: Laminin im Verlauf an 3 Untersuchungszeitpunkten über einen Zeitraum von bis zu 12 Monaten bei Patienten mit chronischer Hepatitis C und Patienten mit Leberzirrhose

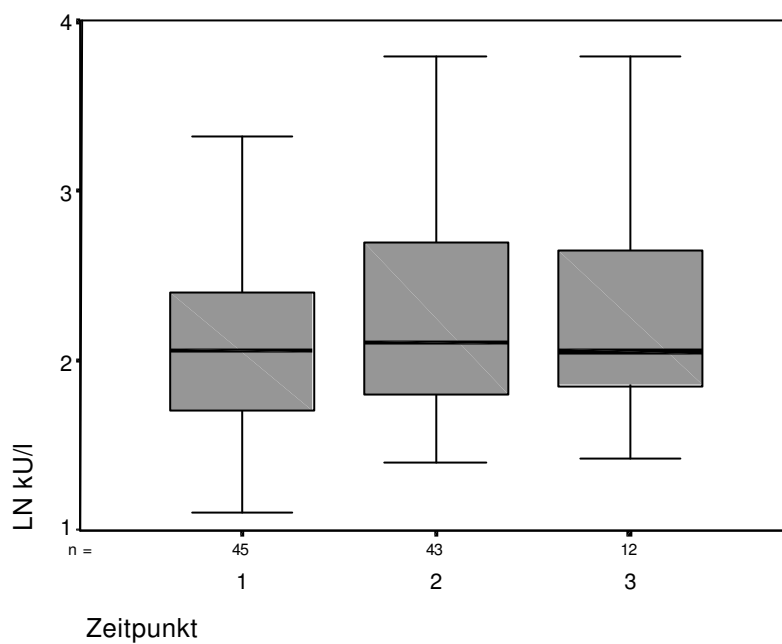
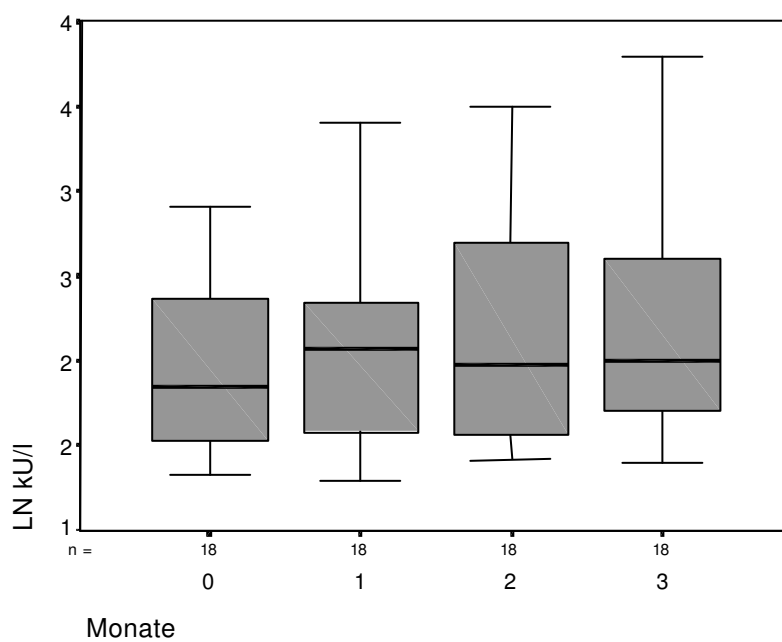


Abb. 21: Laminin in monatlichen Verlaufskontrollen über 3 Monate bei Patienten mit chronischer Hepatitis C und Patienten mit Leberzirrhose



III.4.3. Hyaluronan (HA)

Im Verlauf von bis zu 12 Monaten läßt sich eine leichte Zunahme der Hyaluronanwerte erkennen (Abb. 22). Dieses wird vor allem an den Mittelwerten deutlich, die von 131 µg/l am Zeitpunkt 1 auf 169 µg/l am Untersuchungszeitpunkt 3 ansteigen. Der Median dagegen bleibt fast konstant zwischen 50 und 60 µg/l. Die Diskrepanz in der Höhe der Median- und Mittelwerte läßt sich durch sehr hohe Werte und viele Ausreißer unter den Patienten mit Leberzirrhose erklären.

Die monatlichen Verlaufskontrollen über einen Zeitraum von 3 Monaten dagegen zeigen insgesamt keine deutliche Änderung in den Hyaluronanwerten (Abb. 23). Allerdings nimmt der Mittelwert von 109 µg/l am Zeitpunkt 0 auf 159 µg/l nach einem Monat zu, um dann wieder auf Werte um 100 µg/l abzufallen. Daran wird deutlich, daß die Schwankungen teilweise erheblich sind.

Diese Schwankungen zeigen sich auch in der gesonderten Darstellung der Verlaufswerte der Patienten mit chronischer Hepatitis C (Abb. 24 und 25). Während bei den unbehandelten Patienten die höchsten Werte am Zeitpunkt 2 vorliegen, finden sich diese bei den mit Interferon behandelten Patienten am 3. Untersuchungstermin. Insgesamt ist in beiden Gruppen eine leichte Zunahme der Werte erkennbar.

Abb. 22: Hyaluronan im Verlauf an 3 Untersuchungszeitpunkten über einen Zeitraum von bis zu 12 Monaten bei Patienten mit chronischer Hepatitis C und Patienten mit Leberzirrhose

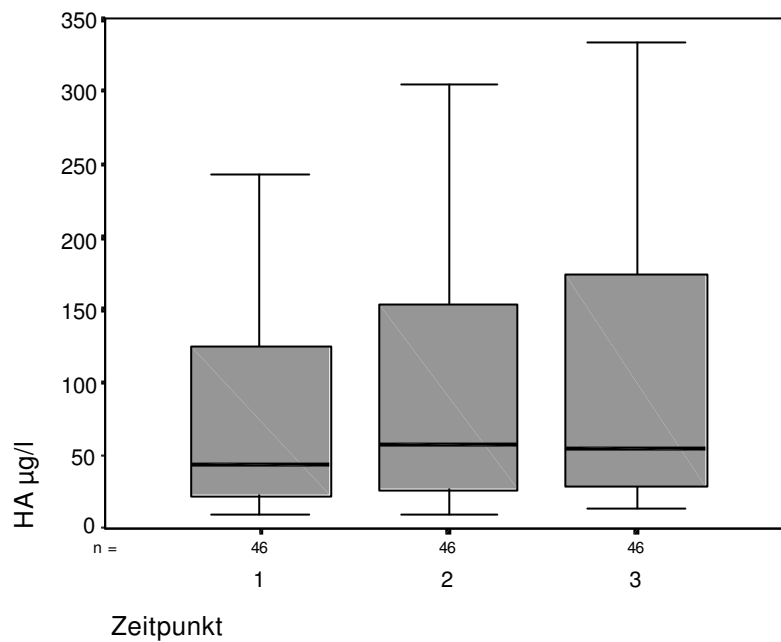


Abb. 23: Hyaluronan in monatlichen Verlaufskontrollen über 3 Monate bei Patienten mit chronischer Hepatitis C und Patienten mit Leberzirrhose

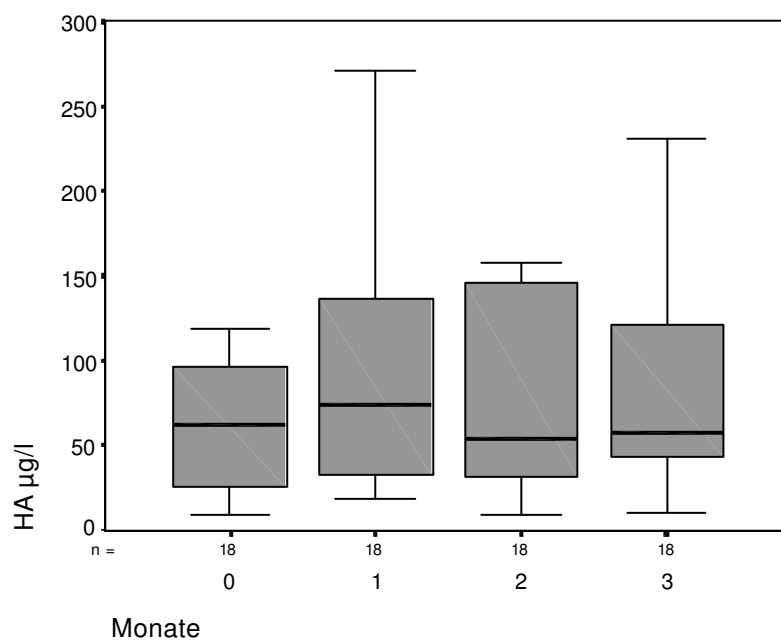


Abb. 24: Hyaluronan im Verlauf an 3 Untersuchungszeitpunkten über einen Zeitraum von bis zu 12 Monaten bei unbehandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C

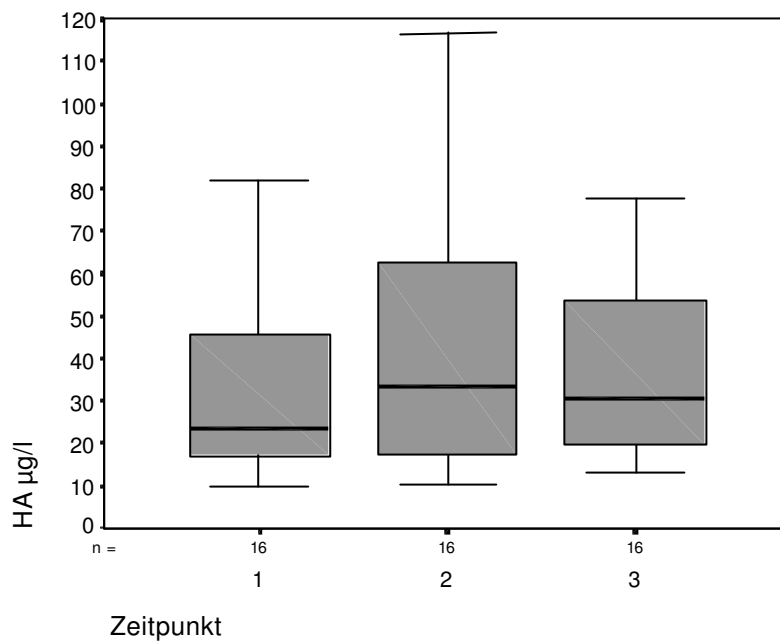
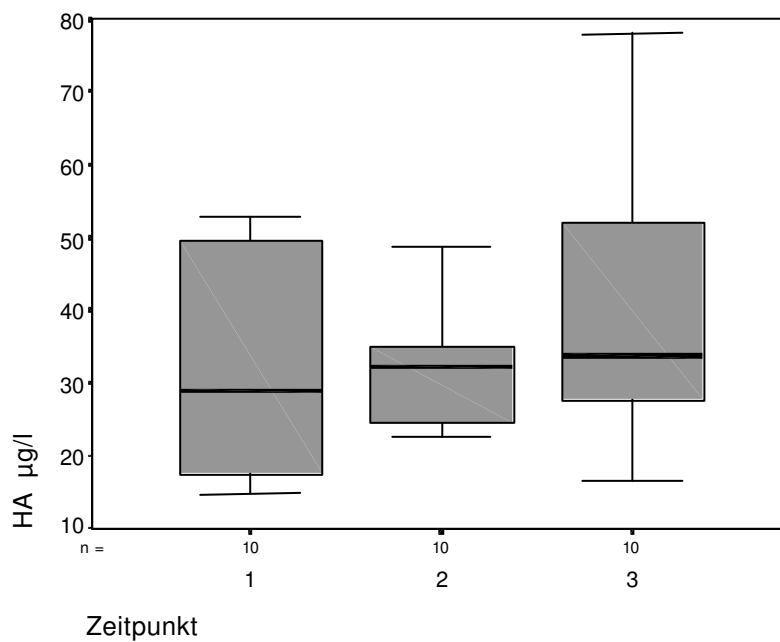


Abb. 25: Hyaluronan im Verlauf an 3 Untersuchungszeitpunkten über einen Zeitraum von bis zu 12 Monaten bei Patienten mit chronischer Hepatitis C unter Interferonbehandlung



III.4.4. Zelluläres Fibronectin (cFN)

Für die Verlaufsbeobachtungen des zellulären Fibronectins gilt, ebenso wie bei den übrigen Fibrosemarkern, daß, bis auf teilweise erhebliche Schwankungen in den Werten, über den beobachteten Zeitraum keine eindeutigen Veränderungen zu erkennen sind. Über den Verlauf von bis zu 12 Monaten kommt es zu einer leichten Zunahme des Medians, während der Mittelwert geringgradig abnimmt (Abb. 26). Zu bemerken ist ebenso, daß viele Ausreißer vorkommen. Die Spannbreite der Werte ist somit sehr groß. Abbildung 27, die die monatlichen Verlaufskontrollen zeigt, unterstreicht die erheblichen Schwankungen. Nach anfänglicher Zunahme in den Werten fallen diese wieder ab.

Die gesonderten Betrachtungen der Patienten mit chronischer Hepatitis C (nicht abgebildet) zeigen eine leichte Abnahme der Mediane bei allerdings zunehmenden Mittelwerten und zunehmender Streuung für die unbehandelten Patienten. Bei den mit Interferon behandelten Patienten findet sich dagegen eine Zunahme der Mediane bei schwankenden Mittelwerten.

Abb. 26: Zelluläres Fibronektin im Verlauf an 3 Untersuchungszeitpunkten über einen Zeitraum von bis zu 12 Monaten bei Patienten mit chronischer Hepatitis C und Patienten mit Leberzirrhose

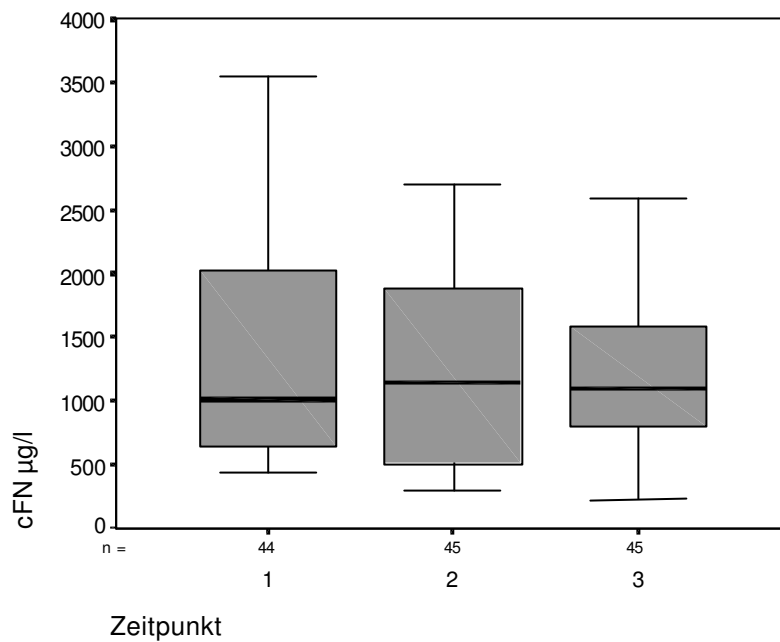
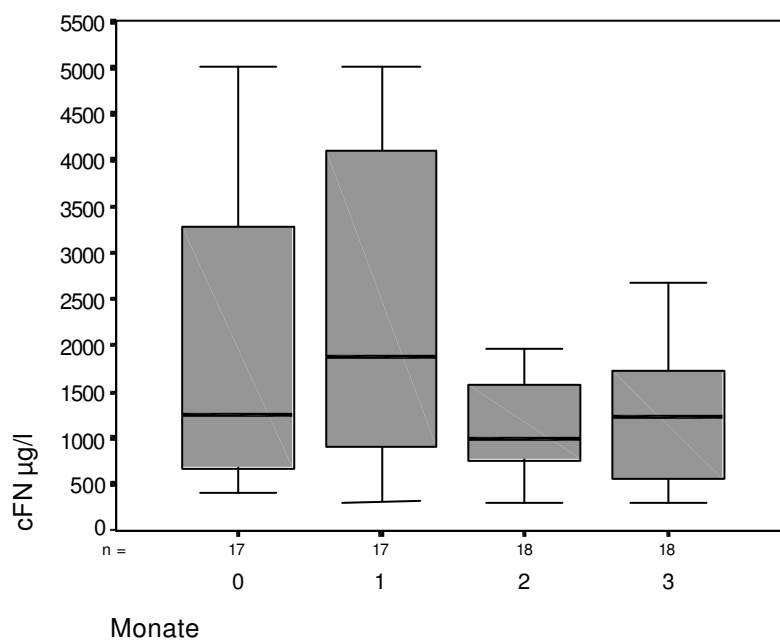


Abb. 27: Zelluläres Fibronektin in monatlichen Verlaufskontrollen über 3 Monate bei Patienten mit chronischer Hepatitis C und Patienten mit Leberzirrhose



III.4.5. Farbkodierte Duplexsonographie (FKDS) der Lebervenen

Die Abbildungen 28-30 zeigen die Veränderungen der Lebervenen-Flußprofile im zeitlichen Verlauf. In Abbildung 28 ist dieses für alle 33 untersuchten Patienten dargestellt. Darunter befinden sich sowohl Patienten mit chronischer Hepatitis C als auch Patienten mit Leberzirrhose. Während zum Zeitpunkt 1 66,6% der 33 Patienten ein normales Flußprofil aufweisen, sind dieses nach 3-10 Monaten noch 58% (19 Patienten). Sechs Patienten zeigen zum Termin 1 einen biphasischen Fluß (HV 1a), 3 einen leicht gewellten (HV 1b) und 2 Patienten einen flachen Fluß (HV 2). Am Untersuchungszeitpunkt 2 findet sich bei keinem Patienten ein flaches Flußprofil, dafür weisen 6 Patienten das Muster HV 1b auf und 8 Patienten das Muster HV 1a.

Insgesamt kommt es nur bei 5 der 33 Patienten zu Veränderungen im zeitlichen Verlauf. Darunter befinden sich 3 Patienten mit Leberzirrhose viraler Genese. Bei einem mit Interferon behandelten Patienten mit chronischer Hepatitis B verbessert sich das Flußprofil von HV 2 auf HV 1b. Ein anderer Patient mit chronischer Hepatitis B hat initial einen triphasischen Fluß, der bei Kontrolle nur noch leicht gewellt ist (HV 1b). Bei dem dritten Patienten, der mit dem Hepatitis C Virus infiziert ist, verschlechtert sich das Profil von HV 0 auf HV 1a.

In den Abbildungen 29 und 30 ist der Verlauf gesondert für die Patienten mit chronischer Hepatitis C ohne Leberzirrhose gezeigt. Abbildung 29 umfaßt 14 Patienten, die nicht mit Interferon behandelt wurden. In dieser Gruppe kommt es bei keinem Patienten zu einer Veränderung des Lebervenen-Flußprofils. Dreizehn Patienten weisen sowohl am Untersuchungszeitpunkt 1 als auch zum Termin 2 einen normalen triphasischen Fluß auf, einer einen biphasischen (HV 1a).

In Abbildung 30 ist der Verlauf von 5 Patienten gezeigt, die während des Beobachtungszeitraumes oder in den letzten 2 Jahren für mindestens 3 Monate mit Interferon behandelt wurden. Bei 3 Patienten mit normalem triphasischem Fluß kommt es zu keiner Veränderung. Ein Patient zeigt nach Absetzen des Interferons eine Verschlechterung von HV 0 auf HV 1b, bei einem anderen verbessert sich das Flußprofil nach Beginn einer Interferontherapie von HV 2 auf HV 1a.

Abb. 28: FKDS im Verlauf an 3 Untersuchungszeitpunkten über einen Zeitraum von 3-10 Monaten bei Patienten mit chronischer Hepatitis C und Patienten mit Leberzirrhose

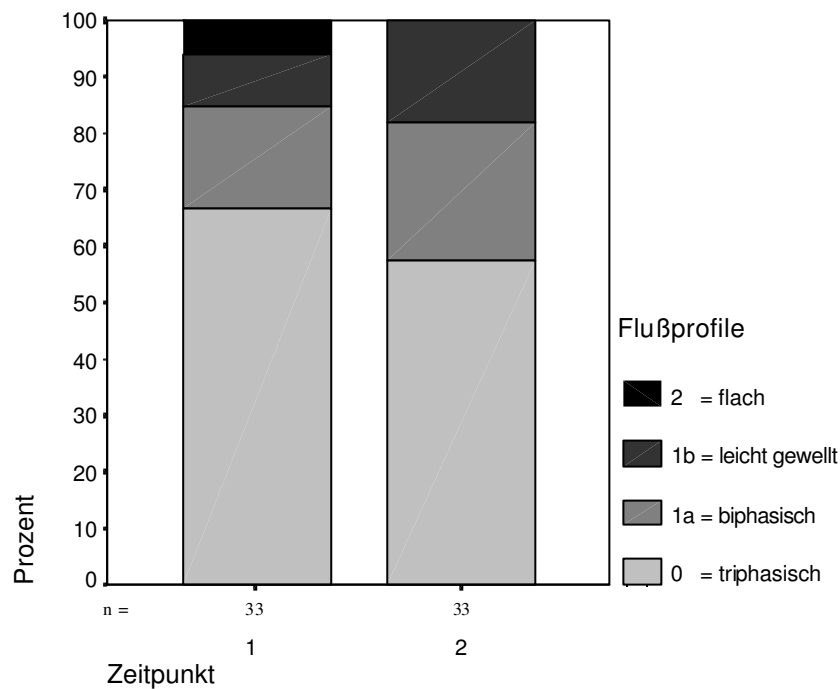


Abb. 29: FKDS im Verlauf an 3 Untersuchungszeitpunkten über einen Zeitraum von 3-10 Monaten bei unbehandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C

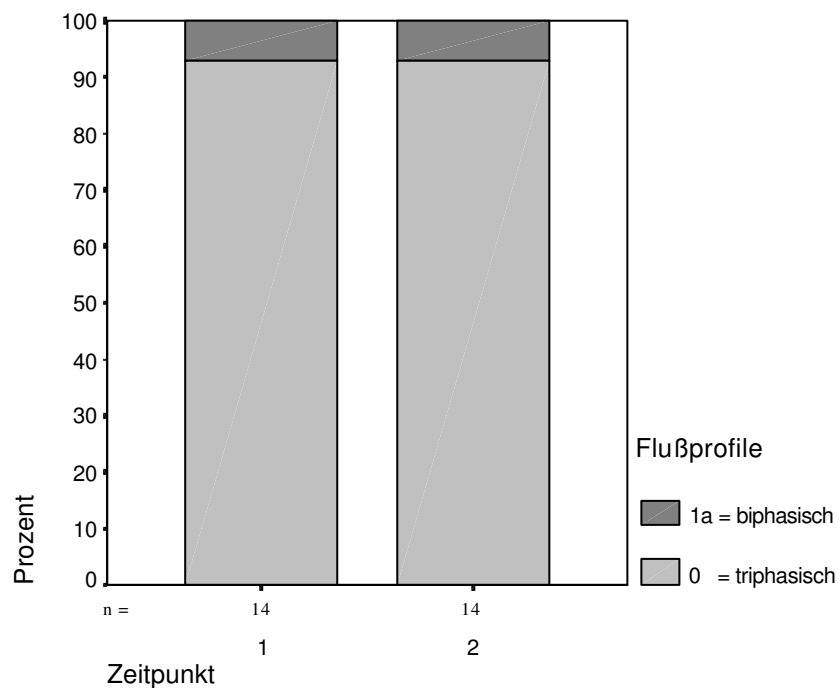
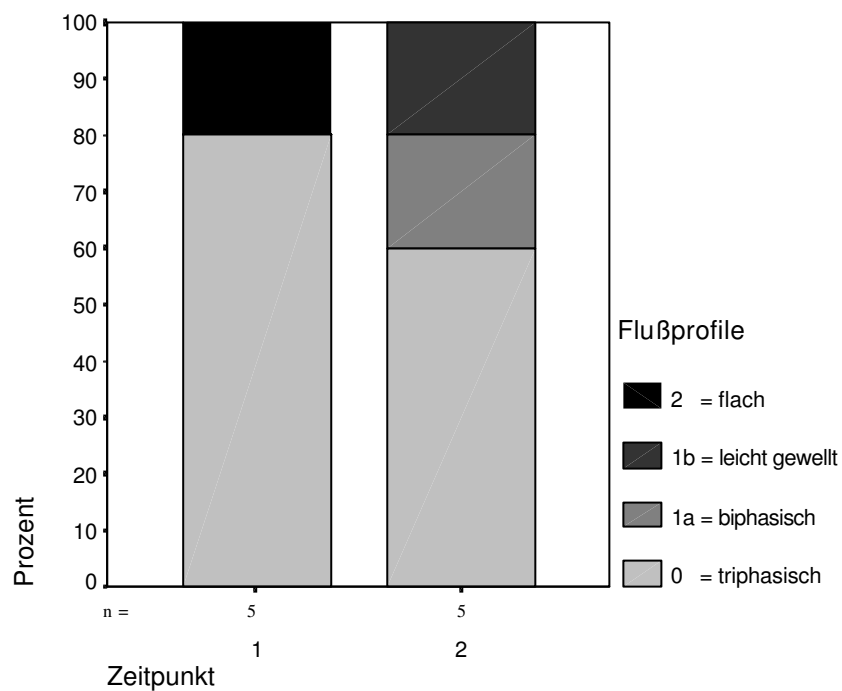


Abb. 30: FKDS im Verlauf an 3 Untersuchungszeitpunkten über einen Zeitraum von 3-10 Monaten bei Patienten mit chronischer Hepatitis C unter Interferonbehandlung



III.5. Einzelverlaufsbeschreibungen

Die Entwicklung der Parameter von 5 Patienten mit chronischer Hepatitis C über den Zeitraum von 12 Monaten ist in den Abbildungen 31-34 exemplarisch für PIIINP und Hyaluronan dargestellt. Dabei werden jeweils die Werte von 2 mit Interferon behandelten Patienten und 3 unbehandelten Patienten unterschiedlicher Schweregrade der Erkrankung in einer Abbildung gezeigt.

Insgesamt erkennt man deutliche Schwankungen in den Werten der einzelnen Patienten. Diese werden besonders deutlich bei den beiden mit Interferon behandelten Patienten G.F. mit CPH und J.C. mit CAH, sowohl für PIIINP (Abb. 31) als auch für Hyaluronan (Abb. 33). Im Verlauf liegen die meisten Werte des Patienten mit CPH unter denen des Patienten mit CAH, allerdings dreht sich dieses Verhältnis durch die Schwankungen zwischenzeitlich um.

Auch die Werte des Patienten H.B. mit Hepatitis C-bedingter Leberzirrhose im Stadium Child A unterliegen massiven Schwankungen (s. Abbildungen 32 und 34). Die beiden unbehandelten Patienten P.S. mit CPH und K.D. mit CAH, deren Verläufe in derselben Abbildung dargestellt sind, zeigen dagegen konstantere Werte. Bemerkenswert ist außerdem, daß, v.a. beim PIIINP, die Werte des Patienten mit CPH über denen des Patienten mit CAH liegen. Der Patient mit Leberzirrhose weist deutlich höhere Werte auf als beide mit ihm abgebildeten Patienten mit chronischer Hepatitis C ohne Leberzirrhose.

Die Einzelverlaufsbeobachtungen für Laminin und das zelluläre Fibronectin (nicht abgebildet) zeigen ebenfalls erhebliche Schwankungen der einzelnen Werte.

Abb. 31: PIINP im Verlauf über 12 Monate bei 2 mit Interferon behandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C: Patient G.F. mit chronisch persistierender Hepatitis (CPH) und Patient J.C. mit chronisch aktiver Hepatitis (CAH)

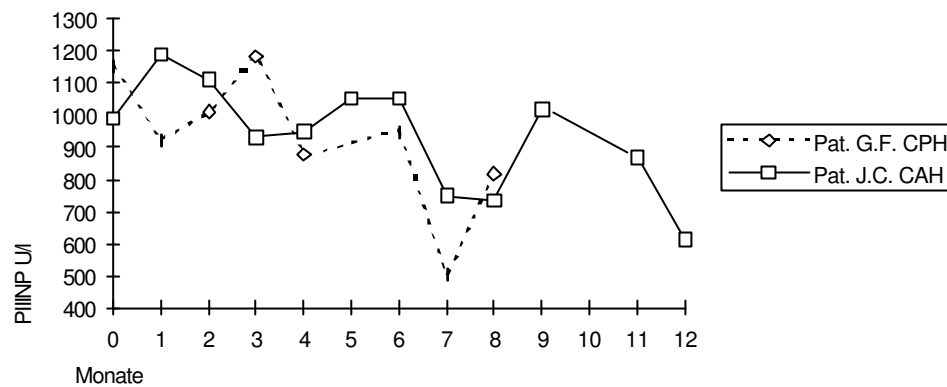


Abb. 32: PIINP im Verlauf über 12 Monate bei 3 unbehandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C: Patient P.S. mit chronisch persistierender Hepatitis (CPH), Patient K.D. mit chronisch aktiver Hepatitis (CAH) und Patient H.B. mit Leberzirrhose im Stadium Child A

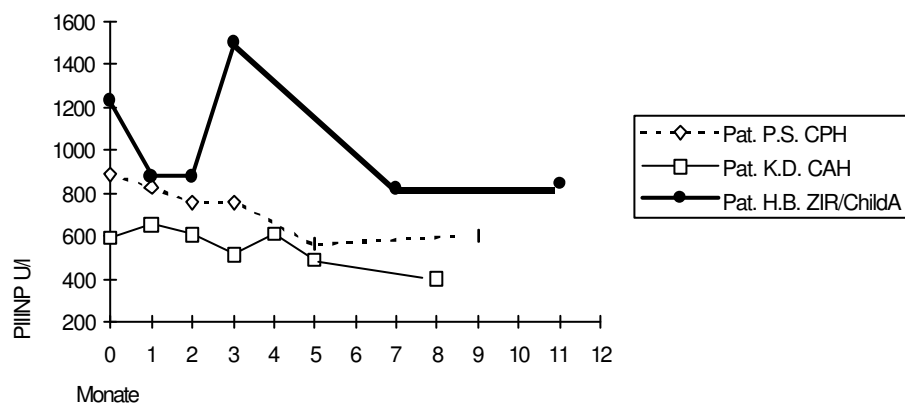


Abb. 33: Hyaluronan im Verlauf über 12 Monate bei 2 mit Interferon behandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C: Patient G.F. mit chronisch persistierender Hepatitis (CPH) und Patient J.C. mit chronisch aktiver Hepatitis (CAH)

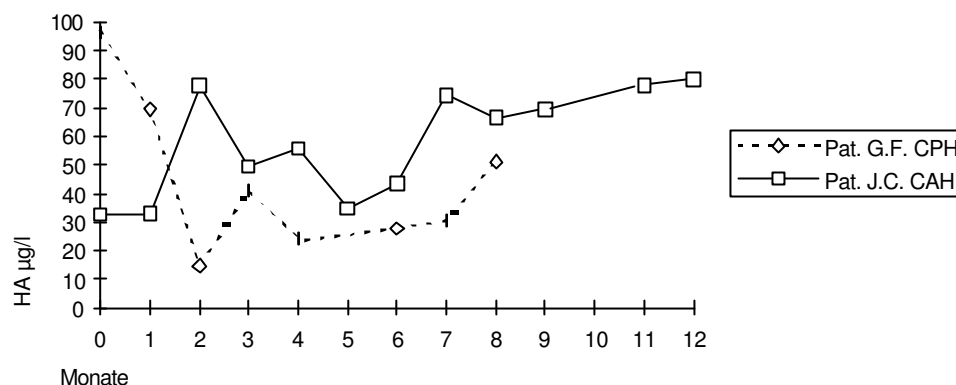
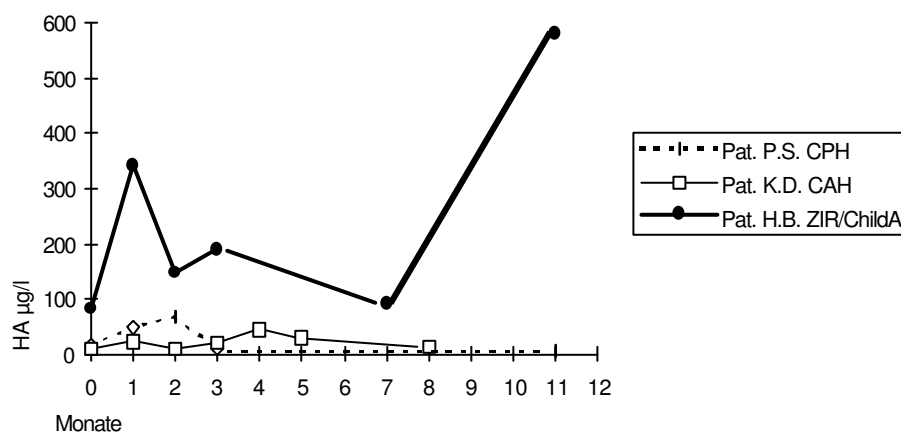


Abb. 34: Hyaluronan im Verlauf über 12 Monate bei 3 unbehandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C: Patient P.S. mit chronisch persistierender Hepatitis (CPH), Patient K.D. mit chronisch aktiver Hepatitis (CAH) und Patient H.B. mit Leberzirrhose im Stadium Child A



IV. Diskussion

IV.1. Bedeutung der Leberfibrogenese für die chronische Hepatitis C

Im Verlauf der meist chronischen Infektion mit dem Hepatitis C Virus ist die Leber einem ständigen Entzündungsreiz ausgesetzt. Die daraus resultierende fortdauernde Schädigung der Leber führt, zunächst klinisch latent, zu fibrotischen Umbauprozessen. Die Leberfibrogenese ist nach Popper ein Schlüsselphänomen chronischer Lebererkrankungen (Popper und Udenfriend 1970).

Dieser Prozeß verläuft bei Patienten mit chronischer Hepatitis C schleichend und ist im Einzelfall in Ausmaß und zeitlichem Verlauf nicht vorhersagbar (Poynard et al. 1997). Trotz des häufig jahrzehntelangen asymptomatischen Verlaufs ist die Entwicklung einer Leberfibrose oft mit dem Übergang in die Zirrhose und somit lebensbedrohlichen Komplikationen verbunden. Dazu zählen die portale Hypertonie mit der Gefahr der Entstehung von rupturierenden Ösophagus-/Fundusvarizen, die hepatische Enzephalopathie oder die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (Tassopoulos 1996).

IV.2. Klinische Relevanz nichtinvasiver Parameter der Leberfibrose

Aufgrund der großen Variabilität und der klinischen Bedeutung der fibrotischen Umbauvorgänge in der Leber ist eine effektive Verlaufskontrolle der Leberfibrogenese bei Patienten mit chronischer Hepatitis C dringend erforderlich.

Da es sich bei der Leberbiopsie um eine statische Momentaufnahme handelt, kann diese kein zuverlässiges Bild der aktiven Fibrogenese liefern. Sie kann nur Aussagen über den Grad der bestehenden Fibrose machen und unterliegt auch dabei dem Stichprobenfehler, da die Probe nicht die gesamte Leber repräsentiert (Gaiani et al. 1997, Kropf et al. 1988, Schuppan et al. 1999). Außerdem handelt es sich um eine invasive Methode, die mit potentiellen Komplikationen verbunden und nicht beliebig oft wiederholbar ist (Casaril et al. 1996, Guécho et al. 1994, Takamatsu et al. 1997).

Somit sind nichtinvasive diagnostische Parameter notwendig, die beliebig oft wiederholbar sind und den aktiven Prozeß der Leberfibrogenese widerspiegeln (Gressner 1987, Plebani und Burlina 1991, Schuppan et al. 1999). Diese können die Leberbiopsie als zentralen Ausgangsbefund zwar nicht ersetzen, würden aber im Rahmen der Verlaufskontrolle wichtige Informationen über den fortschreitenden Krankheitsprozeß liefern (Raedsch et al. 1982, Walsh et al. 2000).

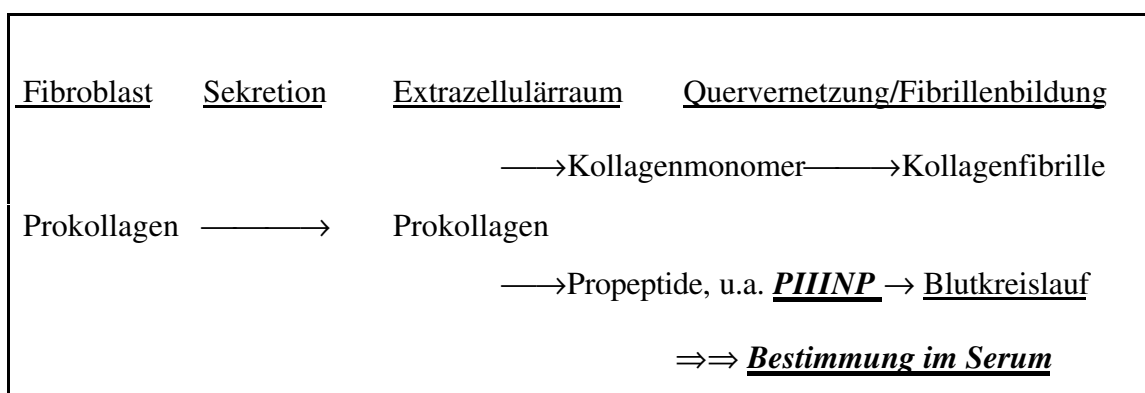
IV.3. Laborchemische Marker der Leberfibrose

IV.3.1. N-terminales Propeptid des Typ III Prokollagens (PIIINP)

Im Bindegewebe der Leber werden neben geringen Mengen von Typ IV, V und VI Kollagen hauptsächlich die Kollagene Typ I und III gefunden. Im Verlauf der Fibrogenese kommt es zur aktiven Bindegewebsvermehrung, also zur verstärkten Produktion dieser Kollagentypen. Dabei synthetisieren die Ito-Zellen (Kent et al. 1976) Prokollagenmoleküle und sezernieren diese in den Extrazellulärraum. Durch Abspaltung von Propeptiden am amino- und carboxyterminalen Ende des Prokollagens entsteht das Kollagenmonomer, welches zu Kollagenfibrillen vernetzt wird. Der Serumspiegel des PIIINP spiegelt somit die Synthese des Typ III Kollagens wider, da das N-terminale Propeptid des Typ III Prokollagens in äquimolarem Verhältnis zum Typ III Kollagen vom Prokollagen Typ III abgespalten wird (Plebani und Burlina 1991, Alcorn und Chojkier 1987) und in den Blutkreislauf gelangt. Abbildung 35 zeigt ein vereinfachtes Schema der Kollagensynthese.

Rohde und Mitarbeiter entwickelten bereits 1979 einen Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung des aminoterminalen Propeptids des Typ III Prokollagens (PIIINP) (Rohde et al. 1979). Dabei handelte es sich um einen Radioimmunoassay mit einem PIIINP Antigen vom Rind. Seitdem wurden weitere Assays entwickelt (Galambos et al. 1985, Niemäla 1985) und Studien mit der Frage der Aussagekraft dieses Markers des Kollagenstoffwechsels im Hinblick auf die hepatische Fibrogenese durchgeführt.

Abb. 35: Vereinfachtes Schema der Biosynthese des Typ III Kollagens



IV.3.1.1. PIIINP im Vergleich der Patientengruppen

Die Untersuchung zeigt deutliche Unterschiede der PIIINP-Werte zwischen den 3 Patientengruppen (Kontrollen, chron. Hep. C und Zirrhose) mit nur geringen Überschneidungen. Dabei liegen die Werte der Patienten mit chronischer Hepatitis C noch überwiegend im oberen Normbereich, während dieser von den meisten Patienten mit Leberzirrhose deutlich überschritten wird. Zwei in der Literatur beschriebene Studien, in denen ebenfalls die PIIINP-Werte von Patienten in verschiedenen Stadien einer chronischen Hepatitis C verglichen wurden, stimmen mit diesem Ergebnis überein (Jeffers et al. 1995, Verbaan et al. 1997). Jeffers und Mitarbeiter fanden signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit milder, moderat bis schwerer CAH und Leberzirrhose. Die Arbeitsgruppe von Verbaan beobachtete Unterschiede zwischen Patienten mit CPH, CAH und Zirrhose mit allerdings großen Überschneidungen.

In den übrigen Studien wurden die Unterschiede der PIIINP-Werte zwischen Patienten mit verschiedenen Schweregraden der Lebererkrankung an anderen Patientenkollektiven untersucht. Die meisten Arbeiten schlossen Patienten mit chronischen Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologien ein, andere untersuchten Patienten mit alkoholischer Lebererkrankung oder Autoimmunhepatitis. Hier zeigten sich die höchsten PIIINP-Werte bei Patienten mit CAH und Leberzirrhose. Die Patienten mit CPH wiesen signifikant niedrigere Werte auf als diejenigen mit CAH (Frei et al. 1984, Plebani und Burlina 1991, Raedsch et al. 1982, Ramadori et al. 1991, Surrenti et al. 1987). In der vorliegenden Untersuchung dagegen findet man nur geringe Unterschiede zwischen den Patienten mit CPH und CAH, während die Werte bei Patienten mit Leberzirrhose bereits im Stadium Child A deutlich höher sind als bei den Patienten mit CAH.

Diese Diskrepanz könnte durch die unterschiedliche Wahl der Patientenkollektive erklärt werden. Möglicherweise kommt es aufgrund des nur sehr langsam progredienten Verlaufs der chronischen Hepatitis C erst im Stadium der Leberzirrhose zu einer deutlichen Erhöhung der PIIINP-Werte. Allerdings bedarf diese These weiterer Untersuchungen an Patienten mit chronischer Hepatitis C.

IV.3.1.2. Verlaufsbeobachtungen

Die Verlaufskontrollen der PIIINP-Werte über den Zeitraum von bis zu 12 Monaten ergeben bis auf einen leichten Abfall der Werte kaum Änderungen. Die Streubreite ist sehr groß. Vor allem die Einzelverlaufsbeobachtungen zeigen ausgeprägte Schwankungen. Diese können möglicherweise auf den schubhaften Verlauf der chronischen Hepatitis C zurückgeführt werden. In der Weise, wie die schwankenden Transaminasen das schubhafte Verhalten der Entzündungsaktivität reflektieren (Colombo 1996, Wiese et al. 1987), könnten die schwankenden PIIINP-Werte durch eine in Schüben stattfindende Produktion und Ablagerung von Kollagenen und der damit verbundenen Freisetzung von Propeptiden zustande kommen.

Die regelmäßigen monatlichen Verlaufskontrollen über 3 Monate bei 18 Patienten zeigen ebenfalls keine eindeutigen Veränderungen. Dieses stimmt mit den Beobachtungen von Raedsch und Mitarbeitern überein, die bei Patienten mit chronischer Hepatitis unterschiedlicher Ätiologie monatliche Kontrollen über ein Jahr durchführten. Bei 28 Patienten traten kaum Änderungen auf, nur bei 2 Patienten kam es unter Therapie mit Steroiden zum Abfall der Werte (Raedsch et al. 1982).

Die gesonderte Auswertung von behandelten und unbehandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C zeigt in der vorliegenden Studie keinen deutlicheren Rückgang der Werte der mit Interferon behandelten Patienten im Vergleich zu unbehandelten Patienten. Im Gegensatz dazu wird in der Literatur durch verschiedene Arbeitsgruppen ein Abfall der Werte bei Interferon-Respondern (Camps et al. 1993, Casaril et al. 1996, Fabris et al. 1999, Gallorini et al. 1994, Ishibashi et al. 1996, Yamada et al. 1998) oder sogar unabhängig vom Response (Suou et al. 1995) beschrieben.

Zusammenfassend zeigt die Untersuchung, daß monatliche Bestimmungen der PIIINP-Werte im Rahmen der Verlaufskontrolle der chronischen Hepatitis C nicht sinnvoll sind. Aufgrund der insgesamt nur geringen Änderungen der Werte und der großen Schwankungsbreite beim einzelnen Patienten rechtfertigt der Informationsgehalt monatlicher Kontrollen nicht die dadurch entstehenden Kosten. Um die Bedeutung des PIIINP im Rahmen des Monitorings der Fibroseentwicklung von Patienten mit chronischer Hepatitis C zu klären, sind weitere Studien mit größeren Intervallen zwischen den Untersuchungszeitpunkten notwendig.

IV.3.1.3. Aussagekraft des PIIINP

Nur wenige Arbeitsgruppen konnten einen Zusammenhang zwischen PIIINP-Werten und dem Ausmaß der bestehenden Leberfibrose nachweisen. Takamatsu und Mitarbeiter führten bei Patienten mit chronischer Virushepatitis eine morphometrische Bestimmung des Kollagengehalts der Leber durch und untersuchten die Zusammenhänge zu verschiedenen Labormarkern des Kollagenstoffwechsels und zum Hyaluronan. Sie fanden für das PIIINP eine schwache Korrelation mit $p < 0,02$. Von den untersuchten Laborparametern zeigte das PIIINP den schwächsten Zusammenhang zum Kollagengehalt der Leber (Takamatsu et al. 1997). Die Arbeitsgruppe von Camps wies dagegen eine Korrelation mit einem $p < 0,001$ zum Fibrosegrad der Leber bei Patienten mit chronischer Hepatitis C nach (Camps et al. 1993), ebenso wie Raedsch und Mitarbeiter bei Patienten mit chronischer Hepatitis unterschiedlicher Ätiologien (Raedsch et al. 1982). Frei und Mitarbeiter fanden einen Zusammenhang zur Fibroblastenzahl und zum Ausmaß der portalen Fibrose bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen verschiedener Ätiologien (Frei et al. 1984).

Die beiden letztgenannten Arbeitsgruppen sind allerdings der Meinung, daß PIIINP mehr die dynamische Fibroseaktivität reflektiert als den Grad und das Ausmaß der bestehenden Leberfibrose. Hierin stimmen sie mit den meisten anderen Autoren überein (Galambos et al. 1985, McCullough et al. 1987, Schneider et al. 1989).

In einigen Studien wurde außerdem eine Korrelation von PIIINP zu Entzündungsaktivität und Nekrose gefunden (Bentsen et al. 1987, Verbaan et al. 1997). Die Autoren gehen davon aus, daß es durch Entzündung und Nekrose zu einer Freisetzung des Propeptids aus den Kollagenfibrillen kommt (Plebani und Burlina 1991). Ramadori und Mitarbeiter vermuten auch eine Stimulation der Kollagensynthese durch die aus den Entzündungsinfiltraten freigesetzten Zytokine (Ramadori et al. 1991).

Es besteht Übereinstimmung darüber, daß das PIIINP den Kollagenstoffwechsel reflektiert. Allerdings wird sein Blutspiegel durch komplexe Interaktionen zwischen Sekretion, Abbau und Verteilung bestimmt, die außerdem durch die Entzündungsaktivität, die renale Clearance und die Gallesekretion beeinflusst werden. Zudem kann es auch durch körperliche Anstrengung und aus extrahepatischen Quellen, z.B. im Rahmen einer Rheumatoiden Arthritis, Sklerodermie, Lungenfibrose oder Paget-Erkrankung, zu einer Erhöhung der PIIINP-Werte kommen (Alcorn und Chojkier 1987). Somit ist nicht

davon auszugehen, daß das Propeptid, das zwar in äquimolaren Mengen zum Kollagen entsteht, auch in genau diesen Mengen im Blut erscheint.

Dennoch handelt es sich um einen wertvollen nichtinvasiven Parameter der Leberfibrogenese bei isolierten chronischen Lebererkrankungen. Die Aussagekraft speziell bei Patienten mit chronischer Hepatitis C haben nur wenige Arbeitsgruppen untersucht (Guéchet et al. 1994 und 1996, Jeffers et al. 1995, Suou et al. 1995, Verbaan et al. 1997).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die These, daß es sich beim PIIINP um einen Marker der Fibroseaktivität und nicht des Fibrosegrads handelt. Nur so lassen sich die großen Schwankungen der Werte im zeitlichen Verlauf erklären. Außerdem werden die Überschneidungen zwischen den Patienten mit chronischer Hepatitis C und den Patienten mit Leberzirrhose und die große Spannbreite der Werte der Zirrhosepatienten verständlich. Liegt z.B. eine weit fortgeschrittene Leberzirrhose mit kaum noch vorhandener entzündlicher und fibrotischer Aktivität vor, kommt es zur Abnahme und gegebenenfalls Normalisierung des PIIINP.

Da aber deutliche Unterschiede der Werte zwischen den untersuchten Patientengruppen und besonders am Übergang von CAH zur Leberzirrhose nachgewiesen wurden, könnte die Bestimmung des PIIINP wertvolle Hinweise auf den Beginn einer Leberzirrhose im Rahmen der Verlaufskontrolle bei Patienten mit chronischer Hepatitis C geben.

IV.3.2. Laminin

Beim Laminin handelt es sich um ein hochmolekulares nichtkollagenes Glykoprotein, das aus 2 Polypeptidketten besteht, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Es ist Bestandteil von Basalmembranen (Timpl et al. 1979).

Während der Leberfibrogenese wird Laminin von den Ito-Zellen synthetisiert und im Disséschen Raum abgelagert. Dort führt es zusammen mit Typ IV Kollagen zur Bildung kontinuierlicher Basalmembranen (Gressner und Tittor 1986, Kropf et al. 1988). Es kommt somit zur „Kapillarisierung“ der Sinusoide, die normalerweise keine Basalmembran aufweisen. Dieses Phänomen läßt sich immunfluoreszenzmikroskopisch nachweisen (Schneider et al. 1989). Der Austausch von Nährstoffen und Metaboliten zwischen Lebergewebe und Blut wird hierdurch erschwert.

Zur quantitativen Bestimmung eines erhöhten Lamininspiegels im Serum wurden Radioimmunoassays entwickelt, die ein Abbauprodukt des Laminins, das pepsinresistente Fragment P1 nachweisen (Risteli et al. 1981).

IV.3.2.1. Laminin im Vergleich der Patientengruppen

Die Untersuchung stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Studien darin überein, daß die Lamininwerte mit zunehmender Schwere der Lebererkrankung ansteigen. Es werden signifikante Erhöhungen bei Patienten mit Leberfibrose und -zirrhose beobachtet, wobei der Anstieg parallel zur Schwere der Fibrose verläuft (Gressner et al. 1987, 1988, Kropf et al. 1988). Untersuchungen an Patienten mit Leberzirrhose konnten außerdem signifikante Unterschiede zwischen den Child-Stadien nachweisen (Collazos et al. 1993, Körner et al. 1996).

Die meisten Studien schlossen allerdings Patienten mit chronischen Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologien ein. Nur 3 Arbeiten wurden an Patienten mit chronischer Hepatitis C durchgeführt.

Walsh und Mitarbeiter beschreiben bei 37 Patienten mit chronischer Hepatitis C deutlich erhöhte Werte im Vergleich zu Kontrollen (Walsh et al. 2000). Die Arbeitsgruppe von Gallorini beobachtete bei 35 Patienten mit chronischer Hepatitis C bei Vorliegen einer CAH oder einer Leberzirrhose signifikant höhere Lamininwerte als bei CPH. Die höchsten Werte wurden bei aktiver Zirrhose gefunden, allerdings unterscheiden sich diese nicht signifikant von denen der Patienten mit CAH (Gallorini et al. 1994). Die Ergebnisse einer anderen Studie stimmen darin überein, daß die Lamininwerte bei chronischer Hepatitis C mit milder Aktivität fast im Normbereich liegen (Fabris et al. 1999). Die vorliegende Arbeit dagegen zeigt nur geringe Unterschiede zwischen den Werten der Patienten mit CPH und CAH, während sich diese dagegen deutlicher von den Patienten mit Leberzirrhose abgrenzen lassen. Die beste Unterscheidung gelingt hier am Übergang vom Stadium Child A zum Stadium Child B der Leberzirrhose.

Aufgrund sehr unterschiedlicher Patientenkollektive sind die einzelnen Studien nur eingeschränkt vergleichbar. Außerdem sind die Fallzahlen der Arbeiten, die Patienten mit chronischer Hepatitis C untersucht haben, relativ klein. Die Untersuchungen stimmen aber darin überein, daß Unterschiede zwischen den Patientengruppen erkennbar sind. Allerdings sind die Überschneidungen größer als beim PIIINP. Eine eindeutige Abgrenzung von Schweregraden gelingt somit mit diesem Marker nicht.

IV.3.2.2. Verlaufsbeobachtungen

Im Gegensatz zum PIIINP steigen die Lamininwerte im zeitlichen Verlauf von bis zu 12 Monaten diskret an. Allerdings sind, ebenso wie bei den monatlichen Kontrollen über 3 Monate, bis auf leichte Schwankungen keine eindeutigen Veränderungen erkennbar. Wie bei den übrigen Fibrosemarkern schwanken die Einzelverlaufswerte stark.

Zwischen behandelten und unbehandelten Patienten sind keine eindeutigen Unterschiede zu beobachten. Dieses Ergebnis stimmt mit 2 Arbeiten überein, die Patienten mit chronischer Hepatitis C vor der Therapie mit Interferon untersucht und über einen Zeitraum von 2 Jahren bzw. 18 Monaten nachbeobachtet haben (Fabris et al. 1999, Gallorini et al. 1994). Gallorini und Mitarbeiter fanden zwar einen leichten Abfall der Lamininwerte bei Interferonrespondern, aber dieser war nicht signifikant. Dagegen konnte eine andere Arbeitsgruppe einen signifikanten Abfall der Lamininwerte bei Patienten mit anhaltendem Response nachweisen (Casaril et al. 1996).

Die Verlaufswerte von Laminin sind allerdings nur sehr vorsichtig zu interpretieren, da es Probleme mit der Genauigkeit des Assays gab. Die im Assay verwandten Antikörper waren nicht monoklonal und wiesen somit unterschiedliche Affinitäten zum Laminin auf. Es kam zu Unterschieden zwischen den Chargen. Aus diesem Grund wurden am Ende dieser Studie keine Lamininbestimmungen mehr durchgeführt. Zum Zeitpunkt 3, also nach 3–12 Monaten, liegen nur noch für 12 Patienten Werte vor. Sowohl die Frage nach der Vergleichbarkeit der bestimmten Werte als auch die Tatsache, daß am letzten Untersuchungstermin nur noch wenige Werte ermittelt wurden, lassen nur eine eingeschränkte Beurteilung zu.

Es ist aber, ebenso wie beim PIIINP, davon auszugehen, daß monatliche Kontrollen nicht zu empfehlen sind. Weitere Studien mit größeren Intervallen sind notwendig, um die Bedeutung des Laminins im Rahmen der Verlaufskontrolle von Patienten mit chronischer Hepatitis C zu klären.

IV.3.2.3. Aussagekraft des Laminins

Es gibt verschiedene Untersuchungen, die einen engen Zusammenhang zwischen der Erhöhung der Lamininwerte und dem Vorliegen einer portalen Hypertonie bei Patienten mit Leberzirrhose nachweisen konnten (Gressner und Tittor 1986, Gressner et al. 1988, Kropf et al. 1991). Man geht davon aus, daß es durch Bildung der Basalmembranen zur Erhöhung des Widerstandes in der Leber und somit zum Anstieg des portalvenösen Druckes kommt.

Andere Autoren dagegen verneinen eine Korrelation zwischen Laminin und Portalvenendruck (Collazos et al. 1993, Körner et al. 1996). Allerdings wurden unterschiedliche Meßmethoden angewandt. Im Gegensatz zur indirekten „blutigen“ Messung des Portalvenendruckes in den oben genannten Arbeiten wurde dieser hier sonographisch bestimmt. Körner und Mitarbeiter wiesen allerdings hohe Laminin- und auch Hyaluronanwerte bei Zirrhosepatienten mit schweren Komplikationen wie therapieresistentem Aszites, hepatischer Enzephalopathie im Stadium III und IV, Pfortaderthrombose oder Tod aufgrund der Lebererkrankung nach. Sie betonen die Rolle des Laminins als Prognosemarker bei Patienten mit Leberzirrhose.

Die meisten Autoren beschreiben einen Zusammenhang zur Leberfibrose. Über den Mechanismus der Erhöhung der Lamininwerte dagegen gibt es unterschiedliche Theorien.

Gressner und Mitarbeiter vermuten das Entweichen eines Teils des neu synthetisierten Laminins ins Blut, bevor es in der Basalmembran verankert wird (Gressner et al. 1988). Sie konnten hohe Konzentrationen von Laminin und PIIINP in den Lebervenen nachweisen, was für eine Erhöhung aufgrund einer vermehrten Synthese spricht und die im Rahmen der Leberzirrhose auftretende eingeschränkte Clearancefunktion der Leber als Ursache in den Hintergrund treten läßt (Gressner et al. 1987).

Kropf und Mitarbeiter gehen davon aus, daß bei portaler Hypertonie und der damit verbundenen Vorbeileitung eines großen Teils des Blutes an der Leber ein verminderter Abbau des Laminins in den Leberendothelzellen stattfindet (Kropf et al. 1991). Eine andere Arbeitsgruppe macht ebenfalls die Leberinsuffizienz für den Anstieg verantwortlich, was durch eine inverse Korrelation des Laminins zu Synthesemarkern bekräftigt wird (Collazos et al. 1993).

Hiermit wird ein Circulus vitiosus beschrieben. Durch vermehrte Synthese des Laminins im Rahmen der Leberfibrogenese kommt es zur Bildung von Basalmembranen, die

zur Entstehung einer portalen Hypertonie beitragen. Diese wiederum führt zu einem verminderten Abbau des Laminins in der Leber und somit zu dessen Anstieg im Blut. Die vorliegende Untersuchung kann keinen Vorteil der Bestimmung des Laminins bei Patienten mit chronischer Hepatitis C im Vergleich zum PIIINP nachweisen. Allerdings sind die Ergebnisse, wie oben erwähnt, vorsichtig zu interpretieren. Der Zusammenhang zur portalen Hypertonie wurde hier nicht untersucht. Weitere Studien an Patienten mit chronischer Hepatitis C sind notwendig, um die Beobachtungen für dieses Patientenkollektiv zu überprüfen. Auch Verlaufskontrollen unter Therapie mit Interferon an größeren Patientengruppen könnten wesentliche neue Informationen bringen.

IV.3.3. Hyaluronan

Das Hyaluronan ist als Glukosaminoglykan ebenfalls Bestandteil der extrazellulären Matrix. Es handelt sich um ein unverzweigtes hochmolekulares Polysaccharid, das im Körper weit verbreitet ist und von Mesenchymzellen, v.a. Fibroblasten, synthetisiert wird. Im Rahmen der Leberfibrogenese findet eine vermehrte Synthese durch die aktivierten Fettspeicherzellen (Ito-Zellen) statt (Gressner und Haarmann 1988, Guéchet et al. 1995, Murawaki et al. 1996).

Das in der Peripherie produzierte Hyaluronan wird durch den Lymphfluß aus den Geweben transportiert (Laurent und Laurent 1981). Ein großer Teil wird in den Lymphknoten abgebaut. Der Anteil, der den Blutstrom erreicht, gelangt zur Leber und wird dort von den Endothelzellen der Sinusoide aufgenommen und in den Lysosomen zu Laktat und Acetat abgebaut (Laurent 1987). Durch die Leberfibrose und -zirrhose wird Hyaluronan als Folge der erhöhten Diffusionsbarriere aufgrund der sinusoidalen Kapillarisierung schlechter aufgenommen, so daß der Abbau in der Leber abnimmt und der Serumspiegel steigt (Ueno et al. 1993).

1980 wurde durch Laurent und Tengblad der erste Radioassay zur Quantifizierung des Hyaluronans in Gewebeproben und in Körperflüssigkeiten entwickelt (Laurent und Tengblad 1980). Nach weiteren Modifizierungen bildete dieser die Grundlage für klinische Studien.

IV.3.3.1. Hyaluronan im Vergleich der Patientengruppen

Das Hyaluronan ist der Fibrosemarker, anhand dessen die beste Unterscheidung zwischen Patienten mit Leberzirrhose und Patienten mit chronischer Hepatitis C ohne Zirrhose gelingt. Bei Vorliegen einer Leberzirrhose kommt es zum deutlichen Anstieg der Werte. Dieses bestätigt die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen, daß mit Hilfe des Hyaluronans mit großer Wahrscheinlichkeit das Vorliegen einer Zirrhose vorhergesagt werden kann (Engström-Laurent et al. 1985, Frébourgh et al. 1986, Lindqvist 1997, Ueno et al. 1993).

Die Untersuchung zeigt einen Anstieg der Werte mit zunehmendem Child-Stadium, allerdings überschneiden sich bei großer Streuung die Werte des Stadiums B stark mit denen im Stadium C. Andere Untersuchungen konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Child Stadien nachweisen (Körner et al. 1996, Murawaki et al. 1996).

Teilweise werden signifikant erhöhte Hyaluronanwerte bei Patienten mit CAH auch ohne Vorliegen einer Leberzirrhose beschrieben (Murawaki et al. 1996, Ramadori et al. 1991). Murawaki und Mitarbeiter sahen bei milden Formen einer chronisch viralen Hepatitis normale, bei moderater Verlaufsform dagegen signifikant erhöhte Werte. Die Arbeitsgruppe von Ramadori fand bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologien signifikant höhere Werte bei CAH als bei CPH.

Hiermit stimmt die vorliegende Untersuchung nicht überein. Die Werte liegen bei CAH nur geringfügig höher als bei CPH und überschreiten den Normbereich von 100 µg/l nur im Einzelfall. Die Arbeit von Gallorini und Mitarbeitern, die ebenfalls Patienten mit chronischer Hepatitis C untersuchten, zeigt ähnliche Ergebnisse (Gallorini et al. 1994).

Die Diskrepanz läßt sich möglicherweise aufgrund der unterschiedlichen untersuchten Patientenkollektive erklären. Wie unten näher aufgeführt wird, besteht ein enger Zusammenhang zwischen Hyaluronan und dem Fibrosegrad der Leber. Geht die chronische Hepatitis bereits mit einer ausgeprägten Leberfibrose einher, sind erhöhte Hyaluronanwerte zu erwarten. Da die Progredienz bei der chronischen Hepatitis C sehr schleichend verläuft, ist nur bei einem kleinen Teil der Patienten von einer schweren Fibrose auszugehen. Die Arbeitsgruppe von Wong zeigte, daß bei chronischer Hepatitis C insgesamt niedrigere Hyaluronanwerte gemessen werden als bei anderen chronischen Lebererkrankungen (Wong et al. 1998). Guéchet und Mitarbeiter konnten nachweisen, daß die Hyaluronanwerte bei chronischer Hepatitis C ohne Fibrose nicht signifikant erhöht sind (Guéchet et al. 1994).

IV.3.3.2. Verlaufsbeobachtungen

Ähnlich wie beim Laminin kommt es im zeitlichen Verlauf über bis zu 12 Monate zum leichten Anstieg der Hyaluronanwerte. Eindeutige Veränderungen sind allerdings nicht erkennbar. Die monatlichen Kontrollen über den Zeitraum von 3 Monaten zeigen bis auf geringe Schwankungen insgesamt ebenfalls keine Veränderungen. Diese Schwankungen werden auch wieder in den Einzelverlaufsdarstellungen deutlich.

In der Literatur werden Studien beschrieben, die den zeitlichen Verlauf der Hyaluronanwerte bei Patienten mit chronischer Hepatitis C unter Behandlung mit Interferon untersuchen. Auch hier finden sich insgesamt keine signifikanten Veränderungen des Hyaluronans im Verlauf (Guéchet et al. 1995, Ninomiya et al. 1998). Diese Beobachtungen werden durch die gesonderte Betrachtung der behandelten und unbehandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C bestätigt, die keine eindeutigen Unterschiede zeigt. In beiden Gruppen steigen die Werte im Verlauf leicht an.

Allerdings umfaßt die Gruppe der behandelten Patienten in der vorliegenden Arbeit alle Personen, die sich während des Beobachtungszeitraumes oder in den vorangehenden 2 Jahren für mehr als 3 Monate einer Interferontherapie unterzogen. Andere Arbeitsgruppen dagegen untersuchten die Patienten direkt vor der Therapie und im Verlauf von mehreren Monaten nach Absetzen des Interferons und unterscheiden die Patienten nach dem Ansprechen auf die Therapie. Drei Arbeiten konnten einen Abfall der Hyaluronanwerte bei Patienten mit anhaltendem Response nachweisen (Guéchet et al. 1995, Ishibashi et al. 1996, Yamada et al. 1998). Ninomiya und Mitarbeiter dagegen sahen auch bei Remission keine signifikanten Veränderungen. Allerdings fanden sie neben anderen Autoren bei den Patienten, bei denen es histologisch zur Verbesserung der Fibrose kam, einen Abfall des Hyaluronans (Guéchet et al. 1995, Ninomiya et al. 1998, Yamada et al. 1998).

Das Hyaluronan zeigt also über den beobachteten Zeitraum und besonders in monatlichen Verlaufskontrollen keine eindeutigen Veränderungen. Es sind allerdings bei histologischer Beurteilung der Fibroseentwicklung Parallelen zu den Hyaluronanwerten erkennbar. Nach diesen Studien könnten Verlaufskontrollen mit Hyaluronan bei Patienten mit chronischer Hepatitis C wichtige Informationen im Hinblick auf die Fibrogenese liefern. Auch hier sind weitere Studien mit größeren Untersuchungsintervallen wünschenswert.

IV.3.3.3. Aussagekraft des Hyaluronans

Eine eindeutige Korrelation des Hyaluronans zum Grad der Leberfibrose konnte sowohl in Studien an Patienten mit chronischer Hepatitis C (Guéchet et al. 1994, 1995, 1996, Ninomiya et al. 1998, Wong et al. 1998, Yamada et al. 1998) als auch an anderen Patientenkollektiven (Murawaki et al. 1996, Pilette et al. 1998, Pontinha et al. 1999) nachgewiesen werden.

Lindqvist findet eine Erhöhung des Hyaluronans in späten Stadien der Leberfibrose, was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmt. Sie ist neben anderen Autoren der Meinung, daß hohe Werte mit großer Wahrscheinlichkeit das Vorliegen einer Leberzirrhose vorhersagen (Engström-Laurent et al. 1985, Lindqvist 1997, Murawaki et al. 1996, Oberti et al. 1997, Ramadori et al. 1991). Oberti behauptet, eine Leberzirrhose könne in 90% der Fälle nichtinvasiv diagnostiziert werden, wobei das Hyaluronan der beste Marker sei. Diese These ist mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit vereinbar, die erst beim Vorliegen einer Leberzirrhose einen eindeutigen Anstieg der Hyaluronanwerte und somit eine gute Abgrenzung von Patienten mit und ohne Leberzirrhose zeigt.

Kropf und Mitarbeiter messen dem Hyaluronan, ebenso wie dem Laminin, eine Bedeutung für die Vorhersage einer portalen Hypertonie bei (Kropf et al. 1991). Körner kann diesen Zusammenhang nicht bestätigen. Wie oben erwähnt, sind die Arbeiten aufgrund unterschiedlicher Meßmethoden des Portalvenendruckes allerdings nur eingeschränkt vergleichbar. Es wird aber die Bedeutung sowohl des Laminins als auch des Hyaluronans als Prognosemarker hervorgehoben (Körner et al. 1996). Auch Guéchet und Mitarbeiter halten das Hyaluronan neben dem Child-Pugh Score für einen wichtigen prognostischen Marker. Sie fanden bei Patienten mit asymptomatischer Leberzirrhose im Rahmen einer chronischen Hepatitis C bei Hyaluronanwerten $> 350\mu\text{g/l}$ signifikant häufiger schwere Komplikationen (Guéchet et al. 2000).

Für die Erhöhung des Hyaluronans machen die meisten Autoren sowohl eine vermehrte Synthese als auch einen verminderten Abbau durch die Leberendothelzellen aufgrund der sinusoidalen Kapillarisation verantwortlich (Frébourgh et al. 1986, Guéchet et al. 1995, 2000, Murawaki et al. 1996). Guéchet vermutet vor der Entstehung einer Leberzirrhose eine vermehrte Synthese des Hyaluronans durch aktivierte Fettspeicherzellen als Ursache, während bei Vorliegen einer Zirrhose der verminderte Abbau durch Sinusendothelzellen im Vordergrund stehe. Andere Autoren heben nur die herabgesetzte Clearancefunktion der Leber als Ursache hervor. Hierfür sei neben der verminderten

Aufnahme durch die Leberendothelzellen im Rahmen der sinusoidalen Kapillarisation auch eine Schädigung der Endothelzellen und die Vorbeileitung des Blutes über Shunts verantwortlich (Engström-Laurent et al. 1985, Kropf et al. 1991, Lindqvist 1997, Ueno et al. 1993).

Erhöhte Hyaluronanwerte finden sich auch bei gesteigerter Produktion außerhalb der Leber, z.B. bei Rheumatoider Arthritis, Sklerodermie, Psoriasis, chronischen Lungenkrankungen und bestimmten Tumoren. Auch bei Niereninsuffizienz, bei Rauchern, nach dem Aufstehen und mit steigendem Alter sind höhere Werte nachweisbar (Guéchet et al. 1995, Levesque et al. 1990, Lindqvist et al. 1988, Pontinha et al. 1999, Wong et al. 1998).

Bezieht man diese Punkte bei der Interpretation mit ein, geben die Hyaluronanwerte wichtige Informationen im Hinblick auf das Vorliegen und die Entstehung einer Leberzirrhose bei Patienten mit chronischer Hepatitis C. Dieser nichtinvasive Parameter der Leberfibrose kann zwar nicht die Histologie ersetzen, könnte aber eine entscheidende Rolle bei der langfristigen Verlaufskontrolle von Patienten mit chronischer Hepatitis C einnehmen.

IV.3.4. Zelluläres Fibronectin

Beim Fibronectin handelt es sich um ein hochmolekulares Glykoprotein, das aus 2 fast identischen Untereinheiten besteht, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Es ist Bestandteil der extrazellulären Matrix und spielt eine wichtige Rolle bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Bei Prozessen wie der Wundheilung und Blutgerinnung ist es von Bedeutung (Pussel et al. 1985).

Das Gesamtfibronectin (tFN) wird unterteilt in das Plasmafibronectin (pFN) und das zelluläre Fibronectin (cFN). Diese strukturell unterschiedlichen Formen entstehen durch alternatives Splicing der prä-mRNA. Das cFN unterscheidet sich vom pFN durch das Vorhandensein der spezifischen Extradomänen EDA, EDB und V (Matsui et al. 1997).

Mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper gegen die EDA Sequenz ist die gezielte Bestimmung des cFN möglich geworden (Kropf et al. 1991, Kropf und Gressner 1995). Fibronectin kommt im Blut in relativ hohen Konzentrationen vor, wobei das cFN nur einen kleinen Teil einnimmt. Während pFN vornehmlich von Hepatozyten synthetisiert wird, produzieren diese nur einen geringen Teil des cFN (Odenthal et al. 1992, Tamkun und Hynes 1983). Dieses entsteht in verschiedenen anderen Zelltypen wie z.B. Gefäßendothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten (De Angelis et al. 1988, Matsuda et al.

1982, Tamkun und Hynes 1983). Ramadori und Mitarbeiter konnten an Zellkulturen von Ratten auch die Synthese von cFN durch aktivierte Fettspeicherzellen nachweisen (Ramadori et al. 1992). Somit ist im Rahmen der Leberfibrogenese eine vermehrte Produktion und daraus resultierend eine erhöhte Blutkonzentration des zellulären Fibronektins zu erwarten.

IV.3.4.1. Zelluläres Fibronektin im Vergleich der Patientengruppen

Die Untersuchung zeigt deutliche Unterschiede der Werte für das zelluläre Fibronektin zwischen den untersuchten Patientengruppen mit steigenden Werten bei zunehmender Schwere der Lebererkrankung. Allerdings sind große Überschneidungen erkennbar. Eine sichere Unterscheidung zwischen Patienten mit chronischer Hepatitis C und Patienten mit Leberzirrhose gelingt anhand dieses Parameters nicht.

Es gibt nur wenige Arbeiten, die das Verhalten des cFN an Patienten mit Lebererkrankungen untersuchen. Die meisten Studien wurden durchgeführt, bevor eine spezifische Unterscheidung der Komponenten des Fibronektins möglich war und geben somit nur Auskunft über das Gesamtfibronektin, welches v.a. das Plasmafibronektin widerspiegelt. Hier zeigen sich erhöhte Werte bei Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis und teilweise auch bei Patienten mit Leberzirrhose. Spätestens im Stadium der Dekompensation kommt es allerdings zum Abfall mit signifikant erniedrigten Werten im Vergleich zu Kontrollen. Dieses wird durch eine verminderte Synthese aufgrund der eingeschränkten Hepatozytenfunktion oder durch einen vermehrten Verbrauch des Fibronektins in der Peripherie erklärt (De Angelis et al. 1988, Gabrielli et al. 1986, Matsuda et al. 1982).

Matsui und Mitarbeiter untersuchten die Expression und Lokalisation von zellulärem Fibronektin an Leberbiopsien von Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen. Sie fanden eine vermehrte Expression von cFN bei Vorliegen einer Fibrose/Zirrhose und bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (Matsui et al. 1997).

Arbeiten an Patienten mit chronischer Hepatitis C liegen in der Literatur nicht vor.

Es ist davon auszugehen, daß das zelluläre Fibronektin zwar eine bedeutende Rolle bei der Leberfibrogenese spielt, eine eindeutige Abgrenzung von Patienten mit Leberzirrhose zu Patienten mit chronischer Hepatitis C ohne Zirrhose gelang allerdings in dieser Untersuchung nicht.

IV.3.4.2. Verlaufsbeobachtungen

Ebenso wie für die übrigen untersuchten Fibrosemarker gilt für das cFN, daß es, abgesehen von erheblichen Schwankungen in den Werten, nicht zu eindeutigen Veränderungen über den beobachteten Zeitraum kommt. Auch die gesonderte Untersuchung der behandelten und unbehandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C ergibt keine zusätzlichen Informationen.

In der Literatur liegen keine Arbeiten vor, die das Verhalten der cFN-Werte bei Patienten mit Lebererkrankungen über einen zeitlichen Verlauf untersuchen.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann diesem Marker keine Bedeutung im Rahmen der Verlaufskontrolle bei Patienten mit chronischer Hepatitis C beigemessen werden, allerdings sind weitere Studien notwendig, um dieses zuverlässig zu klären.

IV.3.4.3. Aussagekraft des zellulären Fibronektins

Wie der Nachweis seiner Produktion durch aktivierte Ito-Zellen (Ramadori et al. 1992) und die vermehrte Expression bei Patienten mit Leberfibrose (Matsui et al. 1997) belegen, kommt dem zellulären Fibronektin eine wichtige Rolle bei der hepatischen Fibrogenese zu.

Allerdings übernimmt es insgesamt im Körper vielfältige Aufgaben bei Interaktionen von Zellen untereinander und zur extrazellulären Matrix, z.B. im Rahmen der Wundheilung, Tumorgenese und Blutgerinnung (Odenthal et al. 1993). Auch seine Bedeutung als Tumormarker wird untersucht (Ylätupa et al. 1995). Somit handelt es sich nicht um einen leberspezifischen Marker.

Dem zellulären Fibronektin kommt zusammengefaßt keine besondere Bedeutung für das Monitoring der Leberfibrogenese bei Patienten mit chronischer Hepatitis C zu.

IV.3.5. Korrelationen der Fibrosemarker untereinander

Alle 4 Fibrosemarker zeigen Korrelationen mit einem $p < 0,001$ untereinander. Den stärksten Zusammenhang findet man zwischen PIIINP und Hyaluronan, gefolgt von Hyaluronan und Laminin. Auch Laminin und PIIINP korrelieren mit einem Koeffizienten $> 0,5$. Das zelluläre Fibronectin weist die schwächste Korrelation zu den übrigen Fibrosemarkern auf.

Nur wenige Arbeitsgruppen haben den Zusammenhang zwischen den einzelnen Fibrosemarkern bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologien untersucht. Für das zelluläre Fibronectin liegen keine Daten vor.

Die übrigen Fibrosemarker zeigen, wie in der vorliegenden Arbeit, Korrelationen untereinander. Allerdings ist die Stärke der Korrelationen nicht exakt vergleichbar, da die Autoren teilweise nur den Korrelationskoeffizienten oder nur den p-Wert angeben und verschieden große Patientenkollektive untersucht haben.

Der deutlichste Zusammenhang wird zwischen Hyaluronan und Laminin gefunden (Körner et al. 1996, Kropf et al. 1991). Dieses könnte damit erklärt werden, daß das Laminin, wie oben ausgeführt, im Rahmen der Fibrogenese der Leber entscheidenden Anteil an der Kapillarisation der Sinusoide mit Bildung kontinuierlicher Basalmembranen hat. Diese trägt zur Erhöhung der Hyaluronanspiegel im Blut bei, da sie dessen Aufnahme in die Sinusendothelzellen erschwert und somit einen verminderten Abbau in der Leber zur Folge hat.

Ramadori und Mitarbeiter weisen ebenfalls eine Korrelation mit $p < 0,001$ zwischen PIIINP und Hyaluronan bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen nach (Ramadori et al. 1991). Gressner findet einen, wenn auch schwachen Zusammenhang zwischen Laminin und PIIINP (Gressner 1987, Gressner und Tittor 1986).

Die insgesamt beobachteten Zusammenhänge zwischen den Fibrosemarkern im Rahmen der Leberfibrogenese bestätigen die Beeinflussung jedes dieser Marker durch den Prozeß der Leberfibrogenese bzw. die Leberfibrose. Zum Beispiel findet eine vermehrte Produktion aller Marker durch die aktivierten Fettspeicherzellen statt. Die Tatsache, daß die Korrelationen unterschiedlich stark sind, zeigt dagegen die Komplexität der zur Erhöhung jedes einzelnen Markers beitragenden Mechanismen. In unterschiedlichem Ausmaß werden durch die Veränderungen in der Leber neben der gesteigerten Synthese auch die Abbauvorgänge beeinflusst. Außerdem kommt es im Rahmen anderer Erkrankungen, wie z.B. der Rheumatoiden Arthritis, zur gesteigerten Synthese.

IV.3.6. Korrelationen der Fibrosemarker mit Routinelaborparametern

Den deutlichsten Zusammenhang zu den Routinelaborparametern zeigt das Hyaluronan. Hierbei besteht v.a. eine Korrelation zu den Parametern, die die Synthesefunktion der Leber widerspiegeln. Dieses bestätigt die Ergebnisse zweier Arbeiten, die bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen inverse Korrelationen des Hyaluronans zu Albumin und Quick und Korrelationen zum Bilirubin nachweisen konnten (Engström-Laurent et al. 1985, Frébourg et al. 1986). Engström-Laurent und Mitarbeiter fanden außerdem einen schwachen Zusammenhang zur AST, was mit der vorliegenden Arbeit übereinstimmt. Während eine Korrelation zur AST besteht, ist diese für die ALT nicht nachweisbar, wie auch 2 weitere Studien bei Patienten mit chronischer Hepatitis C bestätigen (Guéchet et al. 1995, Wong et al. 1998). Nur Murawaki und Mitarbeiter fanden bei Patienten mit chronisch viraler Hepatitis eine stärkere Korrelation des Hyaluronans zur ALT als zur AST (Murawaki et al. 1996). Insgesamt wird aber die starke Korrelation des Hyaluronans zu den Markern der Synthesefunktion der Leber deutlich, was nochmals seine Bedeutung als Spätparameter unterstreicht, der erst bei Vorliegen einer Leberzirrhose oder fortgeschrittenen Fibrose erhöht ist.

Auch PIIINP korreliert mit allen Routineparametern bis auf die ALT. Dabei liegt die schwächste Korrelation zur AST vor. Den stärksten inversen Zusammenhang zeigen Albumin und Quick zum PIIINP. Im Gegensatz dazu weisen andere Autoren eine Korrelation zur ALT nach (Gallorini et al. 1994, Suou et al. 1995). Der deutliche Zusammenhang zum Albumin findet in den meisten Arbeiten Bestätigung. Auch für Bilirubin, Quick, AP und AST werden Korrelationen gefunden (Frei et al. 1984, Guéchet et al. 1994, McCullough et al. 1987, Mutimer et al. 1989, Ramadori et al. 1991, Rohde et al. 1979). Wie beim Hyaluronan besteht somit der stärkste Zusammenhang zu den Synthesemarkern, allerdings ist dieses beim PIIINP weniger deutlich. Auch zu den Parametern der Entzündungsaktivität liegen Korrelationen vor. Diese Beobachtungen bestärken die These, daß PIIINP neben der Leberfibrose v.a. den aktiven Prozeß der Fibrogenese widerspiegelt, der durch die chronische Entzündung initiiert und aufrechterhalten wird.

Auch Laminin zeigt keine Korrelation zur ALT. Zur AST besteht dagegen ein Zusammenhang. Die beste Korrelation findet sich zu Albumin, AP, PCHE und Bilirubin, was die Arbeit von Collazos und Mitarbeitern weitgehend bestätigt (Collazos et al. 1993). Weitere Studien liegen nicht vor. Ebenso wie beim Hyaluronan und beim PIIINP stehen die Zusammenhänge zu den Markern der Synthesefunktion der Leber im Vordergrund.

Das zelluläre Fibronektin dagegen korreliert mit beiden Transaminasen, wenn auch zur ALT nur eine schwache Korrelation vorliegt. Außerdem besteht ein Zusammenhang zu den Cholestasemarkern AP und γ GT, allerdings nicht zum Bilirubin. In der Literatur liegen hierzu keine Arbeiten vor, so daß ein Vergleich nicht möglich ist.

IV.4. Farbkodierte Duplexsonographie (FKDS) der Lebervenen

Die Anwendung der Duplexsonographie zur Beurteilung hämodynamischer Veränderungen bei chronischen Lebererkrankungen hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen (Barbara 1990). Nachdem man sich zunächst auf die Pfortader, v.a. im Rahmen der portalen Hypertonie, beschränkte, werden zunehmend auch Studien der Lebervenen durchgeführt.

Bereits 1989 fiel Longo und Mitarbeitern bei Patienten mit Leberzirrhose ein „pseudo-portales Flußmuster“ der Lebervenen auf (Longo et al. 1989). Bei 37% der darstellbaren Lebervenen von 59 Patienten mit Leberzirrhose wurde, abweichend vom normalen triphasischen Flußprofil der Lebervenen, ein der Pfortader ähnelnder Blutfluß mit fehlendem „reverse flow“ beobachtet.

IV.4.1. Klassifikationen der Lebervenen-Flußprofile

Eine italienische Arbeitsgruppe entwickelte die erste Klassifikation verschiedener Lebervenen-Flußprofile, an der sich die meisten nachfolgenden Studien orientierten (Bolondi et al. 1991). Sie unterscheiden 3 Flußmuster der Lebervenen (HV = hepatic vein), wobei HV 0 den normalen triphasischen Fluß darstellt. HV 1 steht für einen etwas flacheren und biphasischen Fluß mit fehlendem „reverse flow“ und HV 2 für eine komplett flache Wellenform.

Es folgten weitere Klassifikationen anderer Arbeitsgruppen, die in Tabelle 8 aufgeführt sind. Einige übernahmen praktisch die Einteilung nach Bolondi et al. und nannten nur die Flußmuster in „Typ 1, 2 und 3“ (Ando et al. 1993) oder „triphasisch, biphasisch und monophasisch“ (Gorka et al. 1997) um.

Eine japanische Arbeitsgruppe dagegen unterscheidet 6 verschiedene Wellenformmuster der Lebervenen (Ohta et al. 1994). Dabei entspricht HV 0 nach Bolondi et al. Typ 1, HV 1 wurde in die beiden Typen II und III unterteilt und HV 2 in IV und V. Typ VI steht für fehlenden Fluß bei Verschluß der Lebervenen. Diese Einteilung wurde an 100 Patienten mit portaler Hypertonie und Ösophagusvarizen vorgenommen. Bei

84% lag eine Leberzirrhose zugrunde, teilweise mit hepatozellulärem Karzinom (HCC). Außerdem waren Patienten mit extrahepatischer Obstruktion, Budd-Chiari Syndrom und idiopathischer portaler Hypertension in die Studie eingeschlossen. Alle Patienten der Typen V und VI wiesen Läsionen im Sinne von Verschlüssen oder Stenosen der Lebervenen und/oder der Vena cava inferior auf. Bei den Patienten mit Typ VI lag ein Budd-Chiari Syndrom zugrunde.

Die Arbeitsgruppe führte außerdem eine Untersuchung an 120 Patienten mit Leberzirrhose und portaler Hypertonie, bei denen kein HCC vorlag, durch. Für dieses Patientenkollektiv wird nur zwischen 4 verschiedenen Wellenformmustern der Lebervenen unterschieden (Typ I, II, III und IV) (Ohta et al. 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kombination der Klassifikationen nach Bolondi et al. und Ohta et al. gewählt. Dabei entsprechen die Flußprofile HV 0 und HV 2 denen nach Bolondi et al., HV 1 dagegen wird in HV 1a und HV 1b unterteilt. Diese entsprechen den Typen II und III nach Ohta et al.

Die Abbildungen 36-39 zeigen Bilder der verschiedenen Flußprofile.

Tab. 8: Unterschiedliche Klassifikationen der Lebervenen-Flußprofile

Bolondi et al. 1991	Ando et al. 1993	Ohta et al. 1994	Ohta et al. 1995	Gorka et al. 1997	Vorliegende Studie
HV 0 <i>triphasisch</i>	Typ 1 <i>triphasisch</i>	Typ I <i>Triphasisch</i>	Typ I <i>triphasisch</i>	triphasisch	HV 0 <i>triphasisch</i>
HV 1 <i>biphasisch, fehlender reverse flow</i>	Typ 2 <i>biphasisch, fehlender reverse flow</i>	Typ II <i>Biphasisch, fehlender reverse flow</i>	Typ II <i>biphasisch, fehlender reverse flow</i>	biphasisch	HV 1a <i>biphasisch, fehlender reverse flow</i>
		Typ III <i>Verminderte Amplitude</i>	Typ III <i>verminderte Amplitude</i>		HV 1b <i>leicht gewellt</i>
HV 2 <i>flach</i>	Typ 3 <i>flach</i>	Typ IV <i>flach mit leichtem Flattern</i>	Typ IV <i>flach mit leichtem Flattern</i>	mono- phasisch	HV 2 <i>flach</i>
		Typ V <i>komplett flach</i>			
		Typ VI <i>kein Fluß</i>			

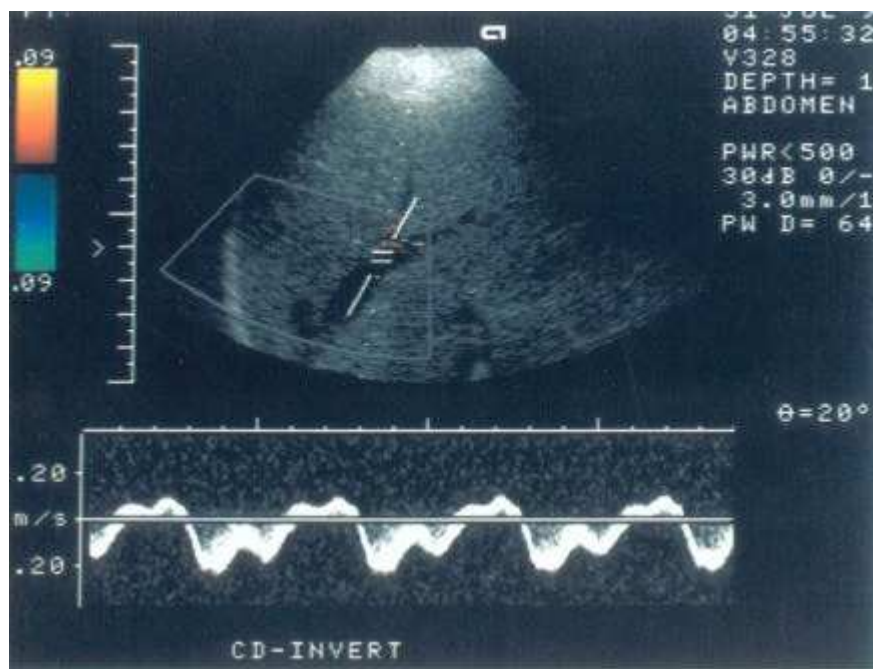
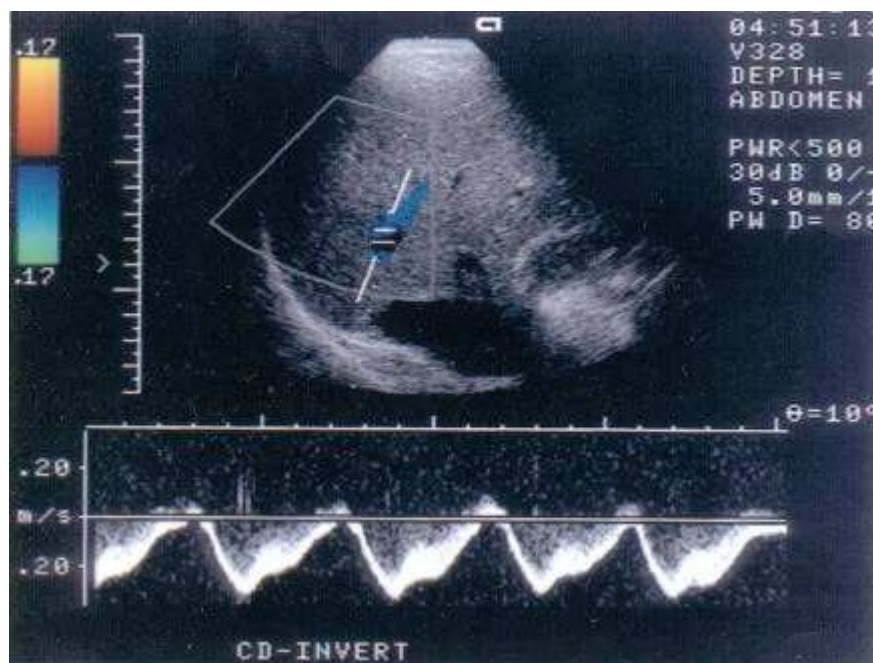
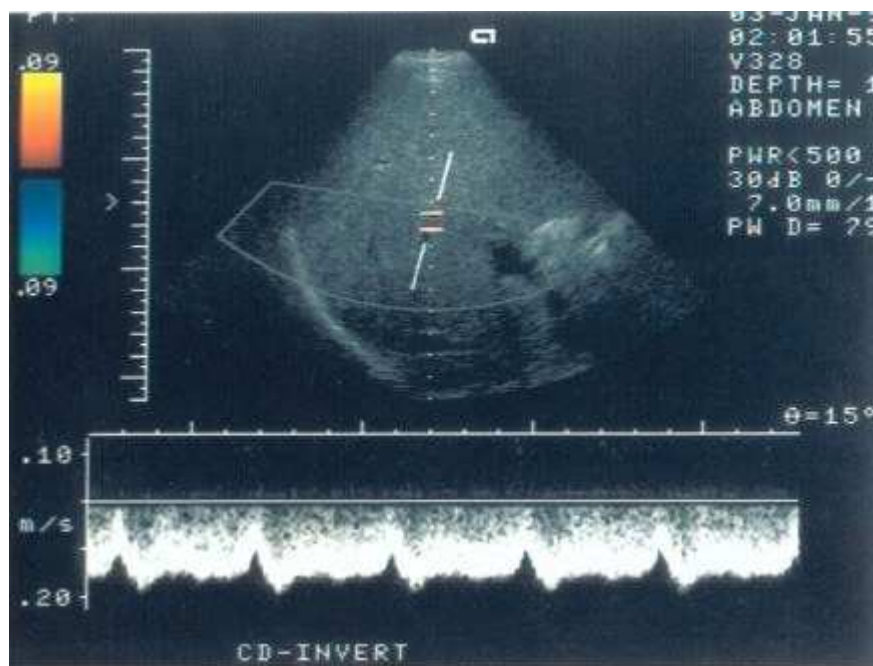
Abb. 36: Lebervenen-Flußprofil HV 0 (triphasisch)**Abb. 37: Lebervenen-Flußprofil HV 1a (biphasisch)**

Abb. 38: Lebervenen-Flußprofil HV 1b (leicht gewellt)**Abb. 39: Lebervenen-Flußprofil HV 2 (flach)**

IV.4.2. Entstehungsmechanismen der Flußprofile

Das normale triphasische Flußprofil der Lebervenen entsteht durch Druckveränderungen im rechten Vorhof. Während der atrialen Systole kommt es kurzzeitig zu einem Blutrückfluß in die Lebervenen („reverse flow“). Die atriale und ventrikuläre Diastole dagegen bedingen jeweils einen Blutfluß aus den Lebervenen zum Herzen. Neben den kardialen Druckverhältnissen wird der Fluß der Lebervenen außerdem durch die Atmung beeinflusst. Zum Beispiel kann tiefe Inspiration durch Zunahme des intraabdominellen Druckes und den daraus resultierenden verminderten Blutfluß zur Leber zu einer Abflachung des Lebervenenflusses führen (Abu-Yousef 1992, Bolondi et al. 1991, Coulden et al. 1992, Shapiro et al. 1993).

Für die Entstehung der pathologischen Abflachung des Flußprofils der Lebervenen existiert dagegen keine übereinstimmende Erklärung. Zunächst ging man von einer Kompression der Lebervenen durch die Regeneratknoten der zirrhotischen Leber als Ursache aus. Dieses wurde durch Beobachtungen an Patienten mit Lebertumoren bekräftigt, die ebenfalls eine Abflachung des Flußprofils zeigten (Longo et al. 1989).

Das Modell konnte allerdings nicht die Beobachtungen an Patienten mit chronischer Hepatitis ohne Leberzirrhose erklären, die zum Teil ein pathologisches Flußprofil aufweisen (Colli et al. 1994, Dietrich et al. 1998). Man vermutet einen Complianceverlust der Lebervenen aufgrund der zunehmenden Starrheit des umgebenden Lebergewebes im Rahmen der Leberfibrose. Außerdem könnte die entzündlich bedingte Hypertrophie der Leberzellen zu einer weiteren Kompression führen (Arda et al. 1997, Bolondi et al. 1991, Morikawa 1991). Ohta und Mitarbeiter halten einen verstärkten hepatovenösen Blutfluß über Umgehungsgebiete im Rahmen der durch Leberatrophie bedingten Verminderung des Lebervenenkalibers für eine weitere Ursache (Ohta et al. 1995).

Lorenz und Winsberg widersprechen dem Modell der herabgesetzten Compliance als Ursache des abgeflachten Lebervenenflusses. Sie beobachteten das Vorkommen fokaler Lebervenenstenosen durch fokale Thrombosen bei 39% der untersuchten Patienten mit diffusen Lebererkrankungen. Alle Patienten mit fokalen Stenosen wiesen einen pathologischen Fluß auf. Sie halten einen erhöhten Widerstand der Lebervenen durch diese fokalen Stenosen für die wahrscheinlichere Ursache des abgeflachten Flußprofils (Lorenz und Winsberg 1996).

IV.4.3. Vergleich der Flußprofile in den Patientengruppen

Die Untersuchung zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Patientengruppen in Bezug auf das Flußprofil der Lebervenen. Sie stimmt damit mit den in der Literatur beschriebenen Studien überein. Der Unterschied wird besonders deutlich zwischen der Gruppe der Patienten mit chronischer Hepatitis C und den Patienten mit Leberzirrhose. Während die Patienten mit chronischer Hepatitis C noch in 89,7% ein normales triphasisches Flußmuster zeigen, ist dieses bei den Patienten mit Leberzirrhose nur noch in 35,5% der Fall. Colli und Mitarbeiter machten ähnliche Beobachtungen (77,8% bei chron. Hep. C und 25% bei Zirrhose) (Colli et al. 1994).

Zwei weitere Arbeitsgruppen fanden dagegen nur noch in weniger als 50% der Fälle mit chronischer Hepatitis einen normalen triphasischen Fluß. Hier sind deutlichere Unterschiede in den Flußprofilen der Lebervenen zwischen den Patienten mit chronischer Hepatitis und den Kontrollen als zwischen den Hepatitis- und Zirrhosepatienten erkennbar (Ando et al. 1993, Dietrich et al. 1998).

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse verschiedener Studien zusammengestellt.

IV.4.3.1. Kontrollen

Alle 15 untersuchten Kontrollpersonen zeigen, in Übereinstimmung mit den meisten vorliegenden Studien (Arda et al. 1997, Bolondi et al. 1991, Colli et al. 1994, Teichgräber et al. 1996), ein normales triphasisches Flußprofil der Lebervenen (HV 0). Eine amerikanische Arbeitsgruppe dagegen untersuchte bei 75 Patienten ohne Leber- oder Herzerkrankungen die mittlere Lebervene und fand nur in 90,7% einen triphasischen Fluß, während die übrigen Patienten eine Abflachung zeigten (Shapiro et al. 1993). Zwei weitere Arbeitsgruppen beobachteten ebenfalls das Vorkommen eines abgeflachten Flußprofils bei Kontrollpersonen (Ando et al. 1993, Dietrich et al. 1998).

Diese Diskrepanz wirft die Frage auf, ob tatsächlich eine Variabilität in dem Flußmuster der Lebervenen gesunder Probanden existiert, wie Shapiro und Mitarbeiter vermuten, oder ob bei den Patienten eine noch nicht diagnostizierte Erkrankung vorlag. Dietrich und Mitarbeiter beschreiben z.B. bei allen Kontrollpersonen mit abgeflachter Wellenform eine sich sonographisch echoreich darstellende Leber, was einen Hinweis auf eine vorliegende Leberveränderung, z.B. Steatose, liefert (Dietrich et al. 1998). Außerdem kann auch der Einfluß der Atmung auf den Lebervenenfluß Ursache möglicher falsch positiver Resultate sein (Shapiro et al. 1993).

Tab. 9: Zusammenstellung der Ergebnisse verschiedener Studien

Autor	Patientenanzahl (n)	Kontrollen	Chronische Hepatitis	Leberzirrhose
Bolondi et al. 1991	65 Kontrollen 60 Zirrhose mit portaler Hypertonie	HV 0: 100%		HV 0: 50,0% HV 1: 31,7% HV 2: 18,3%
Ando et al. 1993	18 Kontrollen 21 Chron. Hep. 27 Zirrhose	Typ 1: 89% Typ 2: 11% Typ 3: 0%	Typ 1: 38% Typ 2: 43% Typ 3: 19%	Typ 1: 22% Typ 2: 41% Typ 3: 37%
Colli et al. 1994	50 Kontrollen 52 Chron. Hep. C, davon 16 mit Zirrhose	HV 0: 100%	HV 0: 77,8% HV 1/2: 22,2%	HV 0: 25% HV 1/2: 75%
Ohta et al. 1994	100 Patienten mit portaler Hypertonie und Ösophagusvarizen			Typ I: 39% Typ II: 31% Typ III: 15% Typ IV: 6% Typ V: 5% Typ VI: 4%
Ohta et al. 1995	120 Zirrhose mit portaler Hypertonie			Typ I: 49,2% Typ II: 30,0% Typ III: 13,3% Typ IV: 7,5%
Teich- gräber et al. 1996	10 Kontrollen 10 Zirrhose	HV 0: 100%		HV 0: 50% HV 1: 40% HV 2: 10%
Arda et al. 1997	30 Kontrollen 30 Zirrhose im Stadium Child A	HV 0: 100%		HV 0: 26,7% HV 1: 60,0% HV 2: 13,3%
Gorka et al. 1997	50 Zirrhose bei chron. Hep. C			triphasisch: 50% biphasisch: 26% monophasisch.: 24%
Dietrich et al. 1998	75 Kontrollen 135 Chron. Hep. C, davon 34 mit Zirrhose	triphasisch: 74,7% biphasisch: 9,3% monophasisch: 16,0%	triphasisch: 49,5% biphasisch: 13,9% monophasisch: 36,6%	triphasisch: 41,2% biphasisch: 26,5% monophasisch: 32,3%
Vorlie- gende Studie	15 Kontrollen 39 Chron. Hep. C 31 Zirrhose	HV 0: 100%	HV 0: 89,7% HV 1a: 7,7% HV 1b: 0% HV 2: 2,6%	HV 0: 35,5% HV 1a: 25,8% HV 1b: 16,1% HV 2: 22,6%

IV.4.3.2. Patienten mit chronischer Hepatitis C

Die Patienten mit chronischer Hepatitis C zeigen zu fast 90% einen normalen triphasischen Fluß. Drei Patienten weisen das Muster HV 1a auf, einer HV 2. Bei dem Patienten mit dem Muster HV 2 und einem der 3 Patienten mit HV 1a liegt eine CAH vor, bei den beiden anderen mit HV 1a eine CPH. Aufgrund der in beiden Untergruppen geringen Anzahl an Patienten mit pathologischem Flußprofil kann keine eindeutige Aussage über die Unterschiede in den Flußprofilen zwischen Patienten mit CPH und CAH gemacht werden.

Die 3 Studien der vorliegenden Literatur, die eine Beurteilung des Lebervenenflusses bei Patienten mit chronischer Hepatitis vorgenommen haben, unterscheiden nicht zwischen CPH und CAH. Wie oben erwähnt, zeigt eine Arbeit ähnliche Werte wie die vorliegende (Colli et al. 1994). Dietrich und Mitarbeiter dagegen fanden bei 13,9% von 101 Patienten mit chronischer Hepatitis C ohne Zirrhose einen biphasischen und sogar bei 36,6% einen monophasischen Fluß. Weniger als die Hälfte wies ein normales Flußprofil auf (Dietrich et al. 1998). In der Untersuchung einer japanischen Arbeitsgruppe zeigten sogar nur 38% von 21 Patienten mit chronischer Hepatitis ein triphasisches Flußprofil (Ando et al. 1993).

Die Diskrepanzen in den Ergebnissen der einzelnen Studien könnten durch unterschiedliche Patientenkollektive bedingt sein. Während die japanische Arbeit mit Patienten mit chronischer Hepatitis unterschiedlicher Genese durchgeführt wurde, schlossen die übrigen Studien nur Patienten mit chronischer Hepatitis C ein. Außerdem lagen möglicherweise verschiedene Schweregrade der chronischen Hepatitis und Unterschiede im Ausmaß von Fibrose und Steatose vor. Für diese beiden Parameter sind bereits Korrelationen zum Lebervenen-Flußprofil nachgewiesen worden (Colli et al. 1994, Dietrich et al. 1998). Zusätzlich kann auch bei den Patienten mit chronischer Hepatitis der Einfluß der Atmung auf den Lebervenenfluß falsch positive Resultate bedingen.

Ein weiterer Grund der unterschiedlichen Ergebnisse könnte die stark differierende Patientenzahl der einzelnen Studien sein. Um eindeutige Aussagen machen zu können, wären Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven notwendig.

IV.4.3.3. Patienten mit Leberzirrhose

Die untersuchten Patienten mit Leberzirrhose unterschiedlicher Ätiologien und Schweregrade weisen nur in 35,5% der Fälle ein normales Flußmuster der Lebervenen auf. 25,8% zeigen das Muster HV 1a, 16,1% HV 1b und 22,5% HV 2. Die gesonderte Betrachtung der 3 Stadien nach Child ergibt deutliche Unterschiede zwischen den Stadien A und B und dem Stadium C. Während in den Stadien A und B noch in mehr als der Hälfte der Patienten ein normaler Fluß vorliegt, findet sich dieser bei keinem der Patienten im Stadium C. Hier zeigen sogar 5 von 9 Patienten einen komplett flachen Fluß. Allerdings sind diese Ergebnisse aufgrund kleiner Patientenzahlen in den Untergruppen vorsichtig zu interpretieren.

Die Ergebnisse bestätigen die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen, daß mindestens 50% der Patienten mit Leberzirrhose ein pathologisches Flußprofil der Lebervenen aufweisen. Der Anteil liegt in 4 Arbeiten bei 50% (Bolondi et al. 1991, Gorka et al. 1997, Ohta et al. 1995, Teichgräber et al. 1996), in den übrigen zwischen 58 und 78% (Ando et al. 1993, Arda et al. 1997, Colli et al. 1994, Dietrich et al. 1998, Ohta et al. 1994). Die Patienten mit Leberzirrhose der vorliegenden Studie zeigen zu 64,5% ein pathologisches Lebervenen-Flußprofil.

In den aufgeführten Arbeiten sind keine Häufigkeiten der Flußprofile für die unterschiedlichen Schweregrade der Leberzirrhose nach Child angegeben. Allerdings beschreiben 2 Arbeitsgruppen eine signifikante (Bolondi et al. 1991, Ohta et al. 1995) und eine etwas schwächere (Ohta et al. 1994) Korrelation der Flußprofile zum Child/Pugh-Wert. Colli und Mitarbeiter fanden eine Korrelation zu Fibrose und Steatose (Colli et al. 1994), während Dietrich und Mitarbeiter den Zusammenhang zwischen intrahepatischem Fettgehalt und monophasischem Fluß bei nur schwacher Korrelation zur Leberfibrose hervorheben (Dietrich et al. 1998).

Eine türkische Arbeitsgruppe schloß nur Zirrhosepatienten im Stadium Child A ein und fand schon in diesem Stadium der Leberzirrhose in mehr als 70% einen pathologischen Fluß (Arda et al. 1997). In der vorliegenden Arbeit dagegen weisen 8 der 14 Patienten (57%) im Stadium Child A ein biphasisches bzw. flaches Flußprofil auf.

Gorka und Mitarbeiter untersuchten bei Patienten mit Leberzirrhose bei chronischer Hepatitis C die Vorhersagekraft der Lebervenen-Wellenform im Hinblick auf das Vorliegen und die Größe von Ösophagusvarizen. Mit einer Sensitivität von 76% bei pathologischem Flußprofil und 92% bei monophasischem Fluß konnte das Vorliegen großer Varizen damit aufgedeckt werden. Die Spezifität betrug 100% (Gorka et al. 1997).

Insgesamt stimmen die verschiedenen Studien in dem Anteil des Vorkommens eines pathologischen Flußprofils bei mindestens 50% der Patienten mit Leberzirrhose überein. Es bestehen allerdings große Unterschiede in der Auswahl der untersuchten Patientenkollektive mit verschiedenen Schweregraden der Leberzirrhose. Während eine Studie nur Patienten im Stadium Child A einschließt (Arda et al. 1997), umfassen die Untersuchungen der japanischen Arbeitsgruppe nur Patienten mit portaler Hypertonie (Ohta et al. 1995) bzw. portaler Hypertonie und Ösophagusvarizen, unter denen sich auch Patienten mit Budd-Chiari Syndrom befinden (Ohta et al. 1994). Dennoch konnten Arda und Mitarbeiter bei einem größeren Anteil ihrer Patienten ein pathologisches Flußprofil nachweisen als Ohta und Mitarbeiter.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Flußprofile der rechten Lebervene, während die Autoren der in der Literatur erwähnten Studien teilweise die mittlere oder die rechte und linke Lebervene darstellten. In letztgenanntem Fall sind in Tabelle 9 die Angaben für die rechte Lebervene aufgeführt. Die japanische Arbeitsgruppe fand deutliche Unterschiede zwischen rechter und linker Lebervene mit häufigerem Vorkommen eines pathologischen Flußprofils in der rechten Lebervene (Ohta et al. 1994 und 1995). Dietrich und Mitarbeiter sind der Meinung, daß die rechte Lebervene die korrektesten Ergebnisse liefert, da in der linken Lebervene aufgrund ihrer topographischen Nähe zum Herzen häufig Artefakte entstehen können. Die Beurteilung der mittleren Lebervene sei bei einigen Patienten nur während tiefer Inspiration möglich und daher ebenfalls artefaktbeladen (Dietrich et al. 1998).

Die zwischen den verschiedenen Studien beobachteten Diskrepanzen finden sich allerdings in gleicher Weise zwischen den Arbeiten, in denen die gleiche Lebervene untersucht wurde wie zwischen denen, die sich unterschiedlicher Lebervenen bedienten.

IV.4.4. Verlaufsbeobachtungen

Bei 5 der im Verlauf von 3-10 Monaten untersuchten Patienten kam es zu einer Veränderung des Lebervenen-Flußprofils. Bei einem Patienten mit chronischer Hepatitis C verbesserte sich der Lebervenenfluß unter Behandlung mit Interferon von HV 2 auf HV 1a. Bei einem anderen Patienten mit Leberzirrhose aufgrund einer chronischen Hepatitis B verbesserte er sich, ebenfalls unter Interferonbehandlung, von HV 2 auf HV 1b. Bei 3 Patienten kam es zu einer Verschlechterung von HV 0 auf HV 1a bzw. HV 1b. Einer von ihnen mit chronischer Hepatitis C entwickelte nach Absetzen des Interferons aus einem triphasischen einen leicht gewellten Fluß, bei den beiden anderen Patienten entstand, bei vorliegender viral bedingter Leberzirrhose, aus einem triphasischen ein biphasischer bzw. leicht gewellter Lebervenenfluß.

In der vorliegenden Arbeit kommt es über den untersuchten Zeitraum nur bei 15% der Patienten zu einer Veränderung des Flußprofils der Lebervenen. Bei 2 mit Interferon behandelten Patienten verbessert sich das Profil unter Therapie, bei einem weiteren Patienten kommt es nach Absetzen der Therapie zur Verschlechterung. Die Interferonbehandlung könnte also in einigen Fällen zu einer Verbesserung des Lebervenen-Flußprofils führen. Aufgrund der geringen Zahlen von im Verlauf untersuchten behandelten Patienten können allerdings keine genaueren Aussagen gemacht werden. Interessanterweise findet sich aber bei keinem der 14 unbehandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C ohne Leberzirrhose eine Veränderung während des Untersuchungszeitraumes, was die Vermutung nahelegt, daß die Veränderungen auf die Therapie zurückzuführen sein könnten.

Da in der vorliegenden Literatur keine Studien mit Verlaufskontrollen der Lebervenen-Flußprofile beschrieben sind, wären weitere Untersuchungen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C mit jährlichen Verlaufskontrollen wünschenswert. Bei behandelten Patienten sind engmaschigere Untersuchungen im Rahmen einer Therapieerfolgskontrolle sinnvoll.

IV.4.5. Zusammenhänge der FKDS mit den Fibrosemarkern

Es finden sich deutliche Korrelationen zwischen der FKDS und allen 4 Fibrosemarkern mit einem $p < 0,001$. Der Zusammenhang ist am ausgeprägtesten zwischen FKDS und Laminin bzw. Hyaluronan mit $r > 0,6$. Somit kann von einer Beeinflussung sowohl der FKDS als auch der Fibrosemarker durch gleiche Faktoren, wie z.B. die Leberfibrose, ausgegangen werden.

Betrachtet man allerdings Werte einzelner Patienten, erkennt man, daß bei kurzfristigen Verlaufskontrollen durch große Schwankungen der Fibrosemarker diese sich nicht immer parallel zu den Flußprofilen der FKDS verhalten. Dieses wird besonders deutlich bei den 5 Patienten, bei denen es im zeitlichen Verlauf zu Veränderungen des Lebervenenflusses gekommen ist. Einer dieser Patienten zeigt keine eindeutigen Veränderungen der Werte für die Fibrosemarker. Bei 2 Patienten kommt es parallel zur Verschlechterung des Flußprofils zu einem Anstieg der Werte für Hyaluronan und zelluläres Fibronektin, während PIIINP leicht abfällt. Ein weiterer Patient zeigt einen Anstieg von cFN und einen Abfall von HA bei Verschlechterung des Flußprofils, während ein anderer bei Verbesserung des Lebervenenflusses einen Abfall von cFN und einen Anstieg von HA aufweist. Über Laminin kann in diesem Zusammenhang keine Aussage getroffen werden, da aufgrund der oben erwähnten analytischen Probleme für die letzten Untersuchungen der Verlaufskontrollen nur wenige Lamininwerte vorliegen.

Die Diskrepanz zwischen dem Verlauf einzelner Patienten und den guten Korrelationen insgesamt läßt sich zum einen durch die große Schwankungsbreite der Werte der Fibrosemarker erklären. Zum anderen reagieren die verschiedenen Untersuchungsmethoden möglicherweise mit einer unterschiedlichen Geschwindigkeit auf Veränderungen in der Leber, so daß im zeitlichen Verlauf Diskrepanzen entstehen können.

In der Literatur liegen keine Arbeiten vor, die den Zusammenhang der FKDS der Lebervenen zu laborchemischen Markern der Leberfibrose untersuchen.

IV.4.6. Aussagekraft der FKDS im Hinblick auf die Leberfibrogenese

Die Untersuchungsergebnisse unterstützen die Vermutung, daß mit Hilfe der farbkodierten Duplexsonographie der Lebervenen Informationen über das Vorliegen einer Leberfibrose gewonnen werden können. Sowohl die deutlichen Unterschiede zwischen den Patientengruppen, bei denen es mit zunehmender Schwere der Lebererkrankung zur Zunahme der pathologischen Veränderungen des Flußprofils kommt, als auch die guten Korrelationen der FKDS mit den laborchemischen Fibrosemarkern bekräftigen diese These.

Allerdings kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob möglicherweise auch andere Reaktionen der Leber als die Fibrose, wie z.B. die Entzündungsaktivität oder der Verfettungsgrad, zu den Veränderungen des Flußprofils beitragen.

Wie oben beschrieben, werden in der Literatur verschiedene Erklärungsmodelle der Abflachung des Flußprofils diskutiert, bei denen neben der Kompression der Lebervenen und dem Complianceverlust durch die Leberfibrose auch eine Kompression durch entzündliche Schwellung der Hepatozyten in Betracht kommt.

In verschiedenen Arbeiten werden, wie oben erwähnt, Korrelationen des Flußprofils zu Fibrose und Steatose und zum Child/Pugh-Wert beschrieben. Allerdings widersprechen sich die Studien teilweise in der Beurteilung der Bedeutung der Fibrose für die pathologischen Veränderungen des Lebervenen-Flußprofils.

In jedem Fall sind Verlaufskontrollen der farbkodierten Duplexsonographie der Lebervenen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C in jährlichen Abständen sinnvoll und können bei pathologischer Abflachung Hinweise auf die Entwicklung einer Leberzirrhose geben.

IV.5. Kritik

Leberhistologie

Die Beurteilung der Aussagekraft nichtinvasiver Parameter der Leberfibrogenese stößt aufgrund fehlender Referenzmethoden an Grenzen, da es bislang keine Methode gibt, die eine zuverlässige Beurteilung der Leberfibrogenese ermöglicht.

Als Goldstandard gilt die Leberhistologie. Wie oben ausgeführt, liefert diese allerdings nur ein statisches Bild des Ausmaßes der Leberfibrose und spiegelt nicht den dynamischen Prozeß der Fibrogenese wider. Außerdem unterliegt sie dem Stichprobenfehler. Dennoch kann die Aussagekraft der untersuchten Laborparameter und der FKDS der Lebervenen nur im Vergleich zur Leberhistologie beurteilt werden.

Aufgrund der Invasivität der Leberbiopsie, die bei einigen Patienten Kontraindikationen oder Ablehnung bedingt, liegt nicht bei allen Patienten ein histologischer Befund vor. 80% der Patienten mit chronischer Hepatitis C unterzogen sich einer Leberbiopsie, allerdings wurde die Untersuchung bei den meisten Patienten nicht am Tag der Blutentnahme bzw. der FKDS der Lebervenen durchgeführt. Bei einzelnen Patienten liegt sie bis zu 4 Jahre zurück, bei den meisten aber höchstens 6 Monate. Mit Hilfe bzw. in Kombination mit anamnestischen, klinischen und laborchemischen Befunden wurde eine Einteilung in CPH und CAH vorgenommen.

Die Beurteilung der Leberhistologie erfolgte noch nach der alten Klassifikation, d.h. die chronische Hepatitis wurde in CPH und CAH eingeteilt (De Groote et al. 1968). Wie oben erwähnt, wird in den letzten Jahren von verschiedenen Autoren eine Klassifikation propagiert, die sowohl ein Grading der Entzündungsaktivität als auch ein Staging der Fibrose vorsieht (Desmet et al. 1994, Ishak et al. 1995). Anhand des Fibrosescores wäre eine zuverlässigere Beurteilung der untersuchten nichtinvasiven Parameter möglich.

Patientenzahlen

Bei der Beurteilung der Vergleiche der Parameter zwischen den Patientengruppen ist zu berücksichtigen, daß es sich um Gruppen mit unterschiedlichen Patientenzahlen handelt. Dieses fällt besonders bei der Untersuchung der Untergruppen (CPH, CAH, ZIR/Child A, B und C) ins Gewicht, wo die Patientenzahlen teilweise sehr klein sind. Vor allem die Angaben der prozentualen Häufigkeiten der jeweiligen Flußprofile in der FKDS der Lebervenen für die Stadien der Leberzirrhose nach Child sind aus diesem Grund vorsichtig zu interpretieren (Abb. 15).

Verlaufsbeobachtungen

Ursprünglich waren monatliche Verlaufskontrollen über 3 Monate vorgesehen. Da nur 18 Patienten regelmäßig zu monatlichen Kontrollen erschienen, wurden diese gesondert ausgewertet. Eine größere Patientenzahl konnte erreicht werden, wenn die Patienten über einen Zeitraum von 12 Monaten beobachtet wurden. Dabei mußte für die jeweiligen Untersuchungszeitpunkte eine relativ große Zeitspanne veranschlagt werden. Der zweite Termin lag im Zeitraum von 1-3 Monaten nach der ersten Vorstellung, der dritte zwischen 3-12 Monaten.

Ein Vergleich der Veränderungen der Fibrosemarker und der Flußprofile der Lebervenen mit der Histologie war nicht möglich, da aus ethischen Gründen keine Kontrollbiopsien durchgeführt wurden. Diese Tatsache schränkt die Aussagekraft der Untersuchungen ein. Zum Beispiel konnten im zeitlichen Verlauf der mit Interferon behandelten Patienten keine eindeutigen Veränderungen der genannten Parameter nachgewiesen werden. Zu diesem Ergebnis kamen auch 2 Studien, die das Verhalten von Hyaluronan unter Interferonbehandlung untersuchten. Sie konnten allerdings durch eine Kontrollbiopsie einen Abfall der Werte bei den Patienten beobachten, die eine Verbesserung des Fibrosescores aufwiesen (Guéchet et al. 1995, Ninomiya et al. 1998). Möglicherweise besteht auch bei dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientenkollektiv ein ähnlicher Zusammenhang, der durch die sich insgesamt nicht deutlich ändernden Werte verschleiert wird.

Interferon

Die Aussagefähigkeit der getrennten Untersuchung der mit Interferon behandelten und der unbehandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C ist durch die geringe Anzahl von nur 11 behandelten Patienten eingeschränkt. Aufgrund der Patientenzahlen wurden alle Patienten, die sich während des Beobachtungszeitraumes oder in den vorangehenden 2 Jahren für mehr als 3 Monate einer Interferontherapie unterzogen, zu der Gruppe der behandelten Patienten gerechnet. Dabei wurde nicht nach dem Response unterschieden. Somit kann der direkte Effekt der Interferontherapie aufgrund der Ergebnisse nicht beurteilt werden. Für diese Fragestellung sind gesonderte Therapiestudien notwendig.

Einflußfaktoren

Wie bereits erwähnt, sind die untersuchten Methoden nicht leberspezifisch. So kann es im Rahmen verschiedener anderer Erkrankungen, besonders bei Vorliegen einer Rheumatoiden Arthritis, zu Erhöhungen der untersuchten Laborparameter kommen. Unter den Patienten mit medikamententoxischer Leberzirrhose befinden sich 2, die an dieser Erkrankung leiden. Allerdings liegen die Werte dieser Patientinnen insgesamt nicht über den Mittelwerten der anderen Patienten mit Leberzirrhose, so daß dieser Fehler zu vernachlässigen ist. Es ist allerdings nicht möglich, alle Faktoren, die zur Erhöhung der Werte führen könnten, auszuschließen.

V. Zusammenfassung

Die chronische Hepatitis C gewann in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung. Durch Isolierung eines cDNA Klonen aus dem Genom des Non A Non B Hepatitisvirus durch Choo und Mitarbeiter wurde 1989 der Nachweis des Hepatitis C Virus ermöglicht. Epidemiologische Studien zeigten, daß es für 70% der chronischen und 20% der akuten Hepatitisfälle verantwortlich ist. Die globale Prävalenz beträgt mit regionalen Unterschieden 3%. In 80% der Fälle nimmt die Infektion einen chronischen Verlauf.

Trotz eines häufig über Jahre asymptomatischen Verlaufs kann die Erkrankung mit schwerwiegenden Komplikationen einhergehen. Die aus der chronischen Schädigung des Leberparenchyms resultierende Fibrogenese führt bei 20-30% der Patienten zur Entwicklung einer Leberzirrhose. Neben der Gefahr einer hepatischen Dekompensation besteht dabei ein erhöhtes Risiko, ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln.

Somit ist eine effektive Verlaufskontrolle von Fibroseausmaß und -aktivität von entscheidender Bedeutung. Sie kann wichtige Informationen im Hinblick auf die Prognose und Therapie der chronischen Hepatitis C mit antiviralen und immunmodulierenden Substanzen wie Interferon und Ribavirin geben.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit nichtinvasiven Parametern der Leberfibrose und -fibrogenese. Sie untersucht die Aussagekraft der Blut- und Serummarker N-terminales Propeptid des Typ III Prokollagens (PIIINP), Laminin, Hyaluronan, zelluläres Fibronectin sowie der semiquantitativen farbkodierten Duplexsonographie (FKDS) der Lebervenen. Ihre Relevanz gegenüber klinischen Befunden, klinisch-chemischen Labormarkern der Entzündungsaktivität und Synthesefunktion der Leber und der Leberhistologie wird geprüft.

Die genannten Parameter wurden bei 59 Patienten mit chronischer Hepatitis C ohne Vorliegen einer Leberzirrhose im Vergleich zu 15 lebergesunden Kontrollpersonen und 50 Patienten mit Leberzirrhose unterschiedlicher Ätiologie untersucht. Bei einem Teil der Patienten wurden Verlaufskontrollen über einen Zeitraum von bis zu 12 Monaten durchgeführt. Einzelne Patienten unterzogen sich monatlichen Verlaufskontrollen.

Der Vergleich der laborchemischen Marker der Leberfibrose zwischen den Gruppen (Kontrollen, chronische Hepatitis C und Leberzirrhose), die noch in verschiedene Schweregrade unterteilt wurden (CPH, CAH, Zirrhose Child A, B und C), zeigt für alle 4 Fibrosemarker steigende Werte mit zunehmender Schwere der Lebererkrankung. Die einzelnen Marker unterscheiden sich allerdings erheblich in der Abgrenzbarkeit der

Gruppen voneinander. Beim PIIINP sind die Überschneidungen im Gegensatz zum Laminin und zum zellulären Fibronectin nur gering. Mit Hilfe des Hyaluronans gelingt die beste Abgrenzung zwischen Patienten mit Leberzirrhose und Patienten, bei denen eine chronische Hepatitis ohne Zirrhose vorliegt. Die ebenfalls untersuchte ALT zeigt einen Anstieg der Werte mit zunehmender Entzündungsaktivität und fällt bei bestehender Leberzirrhose wieder ab. Sie gibt somit keine Hinweise auf das Fibroseausmaß, was auch die schwache Korrelation zu den untersuchten Fibrosemarkern zeigt.

Die Verlaufsbeobachtungen der Labormarker lassen über den untersuchten Zeitraum bis auf teilweise erhebliche Schwankungen in den Werten keine eindeutigen Veränderungen erkennen. Für den klinischen Gebrauch sind somit monatliche Kontrollen nicht zu empfehlen. Weitere Studien mit größeren Intervallen sind notwendig, um sinnvolle Untersuchungsabstände zu bestimmen.

Insgesamt kann anhand der vorliegenden Ergebnisse und der in der Literatur beschriebenen Studien v.a. dem PIIINP und dem Hyaluronan eine Bedeutung für das Monitoring der Leberfibrose und -fibrogenese bei Patienten mit chronischer Hepatitis C beigemessen werden. Dabei spiegelt das PIIINP mehr die fibrotische Aktivität wider, während das Hyaluronan Hinweise auf den Fibrosegrad und somit auf die Entstehung einer Leberzirrhose gibt. Die hier vorliegenden Ergebnisse bezüglich des Laminins sind aufgrund von Problemen mit der Genauigkeit des Assays vorsichtig zu bewerten. Das zelluläre Fibronectin scheint keine zusätzlichen Informationen zu geben.

Die farbkodierte Duplexsonographie (FKDS) der Lebervenen zeigt eine Abflachung des normalerweise triphasischen Lebervenen-Flußprofils bei einem großen Teil der Patienten mit Leberfibrose und -zirrhose. Dabei nimmt der Anteil der Patienten mit pathologischem Lebervenenfluß mit zunehmender Schwere der Lebererkrankung zu. Während bei allen Kontrollpersonen ein triphasisches Flußprofil vorliegt, findet sich dieses nur noch bei 35% der Patienten mit Leberzirrhose. Ein normales Flußprofil schließt eine Leberzirrhose zwar nicht aus, ein pathologischer Lebervenenfluß kann aber wichtige Hinweise auf das Vorliegen einer Leberfibrose/-zirrhose geben.

Die laborchemischen Parameter der Leberfibrose PIIINP und Hyaluronan und die FKDS der Lebervenen geben wesentliche Informationen über Leberfibrose und -fibrogenese im Rahmen der Verlaufskontrolle von Patienten mit chronischer Hepatitis C. Sie können die Leberhistologie als Ausgangsbefund zwar nicht ersetzen, sind aber als nicht-invasive Untersuchungsmethoden beliebig wiederholbar und stellen vor allem in Kombination eine sinnvolle Ergänzung der Diagnostik dar.

VI. Literaturverzeichnis

Abdi, W., Millan, J.C., Mezey E. (1979): Sampling variability on percutaneous liver biopsy. Arch. Intern. Med. 139:667-669

Abu-Yousef, M.M. (1992): Normal and respiratory variations of the hepatic and portal venous duplex doppler waveforms with simultaneous electrocardiographic correlation. J. Ultrasound Med. 11:263-268

Alcorn, J., Chojkier, M. (1987): Procollagen III peptide (PIIIP): Can it reflect hepatic fibrosis? Hepatology 7(5):981-983

Alter, H.J. (1990): Clinical, virological and epidemiological basis for the treatment of chronic non-A, non-B hepatitis. J. Hepatol. 11(Suppl. 1): S19-S25

Alter, H.J., Purcell, R.H., Shih, J.W., Melpolder, J.C., Houghton, M., Choo, Q.L., Kuo, G. (1989): Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. New. Eng. J. Med. 321:1494-1500

Alter, M.J., Coleman, P.J., Alexander, W.J., Kramer, E., Miller, J.K., Mandel, E., Hadler, S.C., Margolis, H.S. (1989): Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and non-A, non-B hepatitis. JAMA 262(9):1201-1205

Ando, Y., Saito, A., Moriya, M., Okada, Y., Kawase, C., Popova, R., Hisamitsu, T., Hayashi, N. (1993): Doppler waveform of the hepatic vein in chronic liver disease: Evaluation with pulsed doppler ultrasonography. Jpn. J. Med. Ultrasonics 20(11): 50-55

Anthony, P.P., Ishak, K.G., Nayak, N.C., Poulsen, H.E., Scheuer, P.J., Sobin, L.H. (1978): The morphology of cirrhosis. J. Clin. Pathol. 31:395-414

- Arda, K., Ofelli, M., Çalikoglu, U., Olçer, T., Cumhuri, T. (1997): Hepatic vein doppler waveform changes in early stage (Child-Pugh A) chronic parenchymal liver disease. *J. Clin. Ultrasound* 25:15-19
- Bachem, M.G., Schüftan, G., Schirmmacher, P., Gressner, A.M. (1994): Feedback mechanisms between α_2 M and TGF β 1 reduce extracellular matrix synthesis of liver fat-storing cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 737:421-424
- Barbara, L. (1990): The value of doppler US in the study of hepatic hemodynamics. Consensus conference. *J. Hepatol.* 10:353-355
- Bedossa, P., Bioulac-Sage, P., Callard, P., Chevallier, M., Degott, C., Deugnier, Y., Fabre, M., Reynés, M., Voigt, J.J., Serge, E. (1994): Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy. Interpretation in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 20 (1, Pt. 1):15-20
- Bentsen, K.D., Hørslev-Petersen, K., Junker, P., Juhl, E., Lorenzen, I. (1987): Serum aminoterminal procollagen type III peptide in acute viral hepatitis. A long-term follow-up study. *Liver* 7:96-105
- Benvegnù, L., Chemello, L., Noventa, F., Fattovich, G., Pontisso, P., Alberti, A. (1998): Retrospective analysis of the effects of interferon therapy on the clinical outcome of patients with viral cirrhosis. *Cancer* 83(5):901-909
- Biagini, G., Ballardini, G. (1989): Liver fibrosis and extracellular matrix. *J. Hepatol.* 8:115-124
- Bianchi, L., De Groote, J., Desmet, V.J., Gedigk, P., Korb, G., Popper, H., Poulsen, H., Scheuer, P.J., Schmid, M., Thaler, H., Wepler, W. (1977): Acute and chronic hepatitis revisited. Review by an international group. *Lancet* 2:914-919
- Blum, H.E. (1994): Virushepatitis A bis E - Diagnostik, Klinik und Therapie. *Ther. Umsch.* 51(8):530-537

- Bolondi, L., Li Bassi, S., Gaiani, S., Zironi, G., Benzi, G., Santi, V., Barbara, L. (1991): Liver cirrhosis: Changes of doppler waveform of hepatic veins. *Radiology* 178: 513-516
- Bonino, F., Oliveri, F., Colombatto, P., Coco, B., Mura, D., Realdi, G., Brunetto, M.R. (1999): Treatment of patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *J. Hepatol.* 31(Suppl. 1):197-200
- Boyer, N., Marcellin P. (2000): Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J. Hepatol.* 32(Suppl. 1):98-112
- Br  chot, C. (1994): Hepatitis C virus genetic variability: Clinical Implications. *Am. J. Gastroenterol.* 89(8):S41-S47
- Brouwer, J.T., Nevens, F., Kleter, B., Elewaut, A., Adler, M., Brenard, R., Chamuleau, R.A.F.M., Michielsens, P.P., Pirotte, J., Hautekeete, M.L., Weber, J., Bourgeois, N., Hansen, B.E., Bronkhorst, C.M., Ten Kate, F.J.W., Heijtkink, R.A., Fevery, J., Schalm, S.W. (1998): Efficacy of interferon dose and prediction of response in chronic hepatitis C: Benelux study in 336 patients. *J. Hepatol.* 28:951-959
- Camps, J., Castilla, A., Ruiz, J., Civeira, M.P., Prieto, J. (1993): Randomised trial of lymphoblastoid α -interferon in chronic hepatitis C. Effects on inflammation, fibrogenesis and viremia. *J. Hepatol.* 17:390-396
- Caporaso, N., Del Vecchio Blanco, G., Tuccillo, C., Loguercio, C., De Sio, I., Morisco, F. (1997): HCV infection in symptom-free patients. *Res. Virol.* 148:123-125
- Casari, M., Capra, F., Gabrielli, G.B., Tognella, P., Rizzi, A., Squarzone, S., De Maria, E., Colombari, R., De Sandre, G., Corrocher, R. (1996): Long-term variations of serum laminin and procollagen III peptide in chronic HCV hepatitis after α -interferon therapy. *Ital. J. Gastroenterol.* 28:15-19

- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., Houghton, M. (1989): Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244(4902):359-362
- Collazos, J., Díaz, F., Genollá, J. (1993): Serum concentrations of laminin in cirrhosis of the liver. *Gut*. 34:974-976
- Colli, A., Cocciolo, M., Riva, C., Martinez, E., Prisco, A., Pirola, M., Bratina, G. (1994): Abnormalities of doppler waveform of the hepatic veins in patients with chronic liver disease: Correlation with histologic findings. *Am. J. Radiol.* 162:833-837
- Colombo, M. (1996): The natural history of hepatitis C. *Baillière's Clin. Gastroenterol.* 10(2):275-288
- Colombo, M. (1999): Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma. *Baillière's Clin. Gastroenterol.* 13(4):519-528
- Coulden, R.A., Lomas, D.J., Farman, P., Britton, P.D. (1992): Doppler ultrasound of the hepatic veins: Normal appearances. *Clin. Radiol.* 45:223-227
- De Angelis, V., Zambon, M., Toffolo, L., Donada, C., Molaro, G.L., Zuin, R. (1988): Fibronectin decrease in liver cirrhosis is related to spleen size. *Klin. Wochenschr.* 66:524-526
- De Bac, C., Clementi, C., Livoli, D., Poliandri, G., Bozza, A., Osso, A., Martuscelli, S., Pasquazzi, C., Petrucci, P., Furlan, C., Taliani, G. (1997): Liver cirrhosis: Epidemiological aspects in Italy. *Res. Virol.* 148:139-142
- De Groote, J., Desmet, V.J., Gedigk, P., Korb, G., Popper, H., Poulsen, H., Scheuer, P.J., Schmid, M., Thaler, H., Uehlinger, E., Wepler, W. (1968): A classification of chronic hepatitis. *Lancet* 2:626-628

- Degos, F. (1994): Epidemiology of hepatitis C virus in Europe. *FEMS Microbiol. Rev.* 14:267-271
- Desmet, V.J., Gerber, M., Hoofnagle, J.H., Manns, M., Scheuer, P.J. (1994): Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 19:1513-1520
- Di Bisceglie, A.M. (1995): Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Semin. Liv. Dis.* 15(1):64-69
- Dienstag, J.L., Alter, H.J. (1986): Non-A, non-B hepatitis: Evolving epidemiologic and clinical perspective. *Semin. Liver Dis.* 6(1):67-81
- Dietrich, C.F., Lee, J.H., Gottschalk, R., Herrmann, G., Sarrazin, C., Caspary, W.F., Zeuzem, S. (1998): Hepatic and portal vein flow pattern in correlation with intra-hepatic fat deposition and liver histology in patients with chronic hepatitis C. *Am. J. Radiol.* 171:437-443
- Duchatelle, V., Marcellin, P., Giostra, E., Bregeaud, L., Pouteau, M., Boyer, N., Auperin, A., Guerret, S., Erlinger, S., Henin, D., Degott, C. (1998): Changes in liver fibrosis at the end of alpha interferon therapy and 6 to 18 months later in patients with chronic hepatitis C: Quantitative assessment by a morphometric method. *J. Hepatol.* 29:20-28
- Dusheiko, G. (1997): Side effects of alpha interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology* 26(Suppl. 1):S112-S121
- Engström-Laurent, A., Löf, L., Nyberg, A., Schröder, T. (1985): Increased serum levels of hyaluronate in liver disease. *Hepatology* 5(4):638-642
- Enomoto, N., Takada, N., Takase, S., Takada, A., Date, T. (1991): Hepatitis C virus RNA genome in plasma of patients with non-A, non-B hepatitis. *Gastroenterol. Jpn.* 26(1):42-46

- Erhardt, A., Petry, W., Ebel, M., Jablonowski, H., Heintges, T., Häussinger, D. (2000): Antivirale Therapie der Hepatitis C. *Z. Gastroenterol.* 38:259-269
- Fabris, P., Marranconi, F., Bozzola, L., Biasin, M.R., De Lazzari, F., Plebani, M., Benedetti, P., Tositti, G., Pellizzer, G., Stecca, C., De Lalla, F. (1999): Fibrogenesis serum markers in patients with chronic hepatitis C treated with α -IFN. *J. Gastroenterol.* 34:345-350
- Fattovich, G., Giustina, G., Degos, F., Tremolada, F., Diodati, G., Almasio, P., Nevens, F., Solinas, A., Mura, D., Brouwer, J.T., Thomas, H., Njapoum, C., Casarin, C., Bonetti, P., Fuschi, P., Basho, J., Tocco, A., Bhalla, A., Galassini, R., Noventa, F., Schalm, S.W., Realdi, G. (1997): Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: A retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterol.* 112:463-472
- Frébourg, T., Delpech, B., Bercoff, E., Senant, J., Bertrand, P., Deugnier, Y., Bourreille, J. (1986): Serum hyaluronate in liver diseases: Study by enzymoimmunological assay. *Hepatology* 6(3):392-395
- Frei, A., Zimmermann, A., Weigand, K. (1984): The N-terminal propeptide of collagen type III in serum reflects activity and degree of fibrosis in patients with chronic liver disease. *Hepatology* 4(5):830-834
- Gabrielli, G.B., Casaril, M., Bonazzi, L., Baracchino, F., Bellisola, G., Corrocher, R. (1986): Plasma fibronectin in liver cirrhosis and its diagnostic value. *Clin. Chim. Acta* 160:289-296
- Gaiani, S., Gramantieri, L., Venturoli, N., Piscaglia, F., Siringo, S., D'Errico, A., Zironi, G., Grigioni, W., Bolondi, L. (1997): What is the criterion for differentiating chronic hepatitis from compensated cirrhosis? A prospective study comparing ultrasonography and percutaneous liver biopsy. *J. Hepatol.* 27:979-985
- Galambos, M.R., Collins, D.C., Galambos, J.T. (1985): A radioimmunoassay procedure for type III procollagen: Its use in the detection of hepatic fibrosis. *Hepatology* 5(1):38-42

- Gallorini, A., Plebani, M., Pontisso, P., Chemello, L., Masiero, M., Mantovani, G., Alberti, A. (1994): Serum markers of hepatic fibrogenesis in chronic hepatitis type C treated with alfa-2a interferon. *Liver* 14:257-264
- Gerber, M.A. (1995): Pathobiologic effects of hepatitis C. *J. Hepatol.* 22(Suppl. 1): 83-86
- Gerber, M.A., Krawczynski, K., Alter, M.J., Sampliner, R.E., Margolis, H.S. (1992): Histopathology of community acquired chronic hepatitis C. *Mod. Pathol.* 5(5): 483-486
- Gholson, C.F., Morgan, K., Catinis, G., Favrot, D., Taylor, B., Gonzalez, E., Balart, L. (1997): Chronic hepatitis C with normal aminotransferase levels: A clinical histologic study. *Am. J. Gastroenterol.* 92(10):1788-1792
- Gilli, P., Moretti, M., Soffritti, S., Menini, C. (1990): Anti-HCV positive patients in dialysis units? *Lancet* 336:243-244
- Glück, T., Seelig, R., Dette, S., Bühring, H.J., Renz, M., Kwon, S., Wiedmann, K.H., Weber, P. (1997): Parameters predicting response to α -interferon treatment in chronic hepatitis C. *Hepato-Gastroenterology* 44:484-491
- Gorka, W., Al Mulla, A., Al Sebayel, M., Altraif, I., Gorka, T.S. (1997): Qualitative hepatic venous doppler sonography versus portal flowmetry in predicting the severity of oesophageal varices in hepatitis C cirrhosis. *Am. J. Radiol.* 169:511-515
- Gressner, A.M. (1985): Pathobiochemie und klinisch-chemische Diagnostik der hepato-genen Enzephalopathie und des Coma hepaticum. *Lab.med.* 9:231-239
- Gressner, A.M. (1986): Fibroplasie der Leber. *Med. Welt* 37:898-905
- Gressner, A.M. (1987): Measurement of connective tissue parameters in serum for diagnosis and follow-up of liver fibrosis. *Ann. Clin. Biochem.* 24:283-292

- Gressner, A.M. (1992): Hepatic fibrogenesis: The puzzle of interacting cells, fibrogenic cytokines, regulatory loops, and extracellular matrix molecules. *Z. Gastroenterol.* 30(Suppl 1):5-16
- Gressner, A.M., Bachem, M.G. (1994): Cellular communications and cell-matrix interactions in the pathogenesis of fibroproliferative diseases: Liver fibrosis as a paradigm. *Ann. Biol. Clin.* 52:205-226
- Gressner, A.M., Bachem, M.G. (1995): Molecular mechanisms of liver fibrogenesis - A homage to the role of activated fat-storing cells. *Digestion* 56:335-346
- Gressner, A.M., Haarmann, R. (1988): Hyaluronic acid synthesis and secretion by rat liver fat storing cells (perisinusoidal lipocytes) in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151(1):222-229
- Gressner, A.M., Kropf, J., Tittor, W. (1987): Estimation of the production rates of serum aminoterminal propeptide of type III procollagen and laminin in human fibrotic liver. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 25:553-559
- Gressner, A.M., Tittor, W. (1986): Serum laminin - Its concentration increases with portal hypertension in cirrhotic liver disease. *Klin. Wochenschr.* 64:1240-1248
- Gressner, A.M., Tittor, W., Kropf, J. (1988): The predictive value of serum laminin for portal hypertension in chronic liver diseases. *Hepato-Gastroenterol.* 35:95-100
- Guéchet, J., Laudat, A., Loria, A., Serfaty, L., Poupon, R., Giboudeau, J. (1996): Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. *Clin. Chem.* 42(4):558-563
- Guéchet, J., Loria, A., Serfaty, L., Giral, P., Giboudeau, J., Poupon, R. (1995): Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C: Effect of α -interferon therapy. *J. Hepatol.* 22:22-26

- Guéchet, J., Poupon, R.E., Giral, P., Balkau, B., Giboudeau, J., Poupon, R. (1994): Relationship between procollagen III aminoterminal propeptide and hyaluronan serum levels and histological fibrosis in primary biliary cirrhosis and chronic viral hepatitis C. *J. Hepatol.* 20:388-393
- Guéchet, J., Poupon, R.E., Poupon, R. (1995): Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis. *J. Hepatol.* 22(Suppl. 2):103-106
- Guéchet, J., Serfaty, L., Bonnard, A.M., Chazouillères, O., Poupon, R.E., Poupon, R. (2000): Prognostic value of serum hyaluronan in patients with compensated HCV cirrhosis. *J. Hepatol.* 32:447-452
- Hahn, E.G., Pencev, D. (1981): Klinische Bedeutung und Diagnose der Leberfibrose. *Internist* 22:562-567
- Hartroft, W.S., Ridout, J.H. (1951): Pathogenesis of cirrhosis produced by choline deficiency; escape of lipid from fatty hepatic cysts into biliary and vascular systems. *Am. J. Pathol.* 27:951-989
- Hino, K., Sainokami, S., Shimoda, K., Iino, S., Wang, Y., Okamoto, H., Miyakawa, Y., Mayumi, M. (1994): Genotypes and titers of hepatitis C virus for predicting response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.* 42(3):299-305
- Hofmann, H. (1990): Diagnostik und Epidemiologie der Hepatitis C. *AMA* 17(5): 104-107
- Hofmann, H., Kunz, C. (1990): Low risk of health care workers for infection with hepatitis C virus. *Infection* 18(5):286-288
- Hoofnagle, J.H. (1999): Management of hepatitis C: Current and future perspectives. *J. Hepatol.* 31(Suppl. 1):264-268

- Hoofnagle, J.H., Mullen, K.D., Jones, D.B., Rustgi, V., Di Bisceglie, A., Peters, M., Waggoner, J.G., Park, Y., Jones, E.A. (1986): Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. *N. Engl. J. Med.* 315:1575-1578
- Hoofnagle, J.H., Tralka, T.S. (1997): National institutes of the health consensus development conference panel statement: Management of hepatitis C. *Hepatology* 26(Suppl. 1):1S-10S
- Ishak, K., Baptista, A., Bianchi, L., Callea, F., De Groote, J., Gudat, F., Denk, H., Desmet, V., Korb, G., MacSween, R.N.M., Phillips, M.J., Portmann, B.G., Poulsen, H., Scheuer, P.J., Schmid, M., Thaler, H. (1995): Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J. Hepatol.* 22:696-699
- Ishibashi, K., Kashiwagi, K., Ito, A., Tanaka, Y., Nagasawa, M., Toyama, T., Ozaki, S., Naito, M., Azuma, M. (1996): Changes in serum fibrogenesis markers during interferon therapy for chronic hepatitis type C. *Hepatology* 24(1):27-31
- Ito, T., Nemoto, M. (1952): Über die Kupfferschen Sternzellen und die "Fettspeicherszellen" ("fat storing cells") in der Blutkapillarenwand der menschlichen Leber. *Okajima Folia Anat. Jpn.* 24:243-258
- Iwarson, S. (1992): The main five types of viral hepatitis: An alphabetical update. *Scand. J. Infect. Dis.* 24:129-135
- Janot, C., Couroucé, A.M., Group de travail „Hépatites virales“ (1990): Intérêt du test RIBA pour le diagnostic des anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C. *Rev. Fr. Transfus. Hémobiol.* 33:439-446
- Jeffers, L.J., Coelho-Little, M.E., Cheinquer, H., Vargas C., Civantos, F., Alvarez, L., Reddy, R., Parker, T., De Medina, M., Li, X., Hill, M., La Rue, S., Schiff, E.R. (1995): Procollagen-III peptide and chronic viral C hepatitis. *Am. J. Gastroenterol.* 90(9):1437-1441

- Jenkins, P.J., Cromie, S.L., Scott Bowden, D., Finch, C.F., Dudley, F.J. (1996): Chronic hepatitis C and interferon alfa therapy: Predictors of long term response. *MJA* 164:150-152
- Karino, Y., Matsushima, T., Saga, A., Tsuyuguchi, M., Miyazaki, T., Toyota, J. (1991): Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with interferon. *Gastroenterol. Jpn.* 26(Suppl. 3):234-238
- Kato, N., Yokosuka, O., Hosoda, K., Ito, Y., Ohto, M., Omata, M. (1993): Quantification of hepatitis C virus by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: Increase of the virus in advanced liver disease. *Hepatology*. 18(1):16-20
- Kent, G., Gay, S., Inouye, T., Bahu, R., Minick, O.T., Popper, H. (1976): Vitamin A-containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73(10):3719-3722
- Khan, M.H., Farrell, G.C., Byth, K., Lin, R., Weltman, M., George, J., Samarasinghe, D., Kench, J., Kaba, S., Crewe, E., Liddle, C. (2000): Which patients with hepatitis C develop liver complications? *Hepatology* 31(2):513-520
- Kiyosawa, K., Tanaka, E., Sodeyama, T., Furuta, S. (1994): Natural history of hepatitis C. *Intervirology* 37:101-107
- Knodell, R.G., Ishak, K.G., Black, W.C., Chen, T.S., Craig, R., Kaplowitz, N., Kiernan, T.W., Wollman, J. (1981): Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1(5):431-435
- Koff, R.S. (1991): Transforming growth factors in human chronic hepatitis and cirrhosis: Correlations with fibrogenesis and hepatic regeneration. 101(5):1445-1446
- Körner, T., Kropf, J., Gressner, A.M. (1996): Serum laminin and hyaluronan in liver cirrhosis: Markers of progression with high prognostic value. *J. Hepatol.* 25:684-688

- Kropf, J., Gressner, A.M. (1995): Two sensitive time-resolved fluoroimmunoassays for cellular fibronectin. *Clin. Chem.* 41(9):1283-1287
- Kropf, J., Gressner, A.M., Tittor, W. (1991): Logistic-regression model for assessing portal hypertension by measuring hyaluronic acid (hyaluronan) and laminin in serum. *Clin. Chem.* 37(1):30-35
- Kropf, J., Gressner, A.M., Negwer, A. (1988): Efficacy of serum laminin measurement for diagnosis of fibrotic liver diseases. *Clin. Chem.* 34(10):2026-2030
- Kropf, J., Quitte, E., Gressner, A.M. (1991): Time-resolved immunofluorometric assays with measurement of a europium chelate in solution: Application for sensitive determination of fibronectin. *Anal. Biochem.* 197:258-265
- Kuo, G., Choo, Q.L., Alter, H.J., Gitnick, G.L., Redeker, A.G., Purcell, R.H., Miyamura, T., Dienstag, J.L., Alter, M.J., Stevens, C.E., Tegtmeier, G.E., Bonino, F., Colombo, M., Lee, W.S., Kuo, C., Berger, K., Shuster, J.R., Overby, L.R., Bradley, D.W., Houghton, M. (1989): An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244(4902):362-364
- Lau, J.Y.N. (1998): Mechanisms of hepatic toxicity. IV. Pathogenetic mechanisms involved in hepatitis C virus-induced liver diseases. *Am. J. Physiol.* 275(6Pt1):G1217-1220
- Laurent, T.C. (1987): Biochemistry of hyaluronan. *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.* 442:7-24
- Laurent, U.B.C., Laurent, T.C. (1981): On the origin of hyaluronate in blood. *Biochem. Int.* 2(2):195-199
- Laurent, U.B.C., Tengblad, A. (1980): Determination of hyaluronate in biological samples by a specific radioassay technique. *Anal. Biochem.* 109:386-394

- Levesque, H., Chassagne, P., Frebourg, T., Delpech, B. (1990): Acide hyaluronique. Intérêts et perspectives de son dosage sérique. *Presse Méd.* 19(21):1001-1005
- Lindqvist, U. (1997): Is serum hyaluronan a helpful tool in the management of patients with liver diseases? *J. Intern. Med.* 242:67-71
- Lindqvist, U., Engström-Laurent, A., Laurent, U., Nyberg, A., Björklund, U., Eriksson, H., Pettersson, R., Tengblad, A. (1988): The diurnal variation of serum hyaluronan in health and disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 48:765-770
- Longo, J.M., Eleno, A., Bilbao, J.I., Caballo, J.R., Aquerreta, J.D., Fernandez, A. (1989): Duplex doppler of the hepatic veins in patients with cirrhosis: Pseudoportal pattern. *Radiology* 173(P):361(abstract)
- Lorenz, J., Winsberg, F. (1996): Focal hepatic vein stenoses in diffuse liver disease. *J. Ultrasound Med.* 15:313-316
- Ludlam, C.A., Chapman, D., Cohen, B., Litton, P.A. (1989): Antibodies to hepatitis C virus in haemophilia. *Lancet* 334:560-561
- Maier, K.P. (1994): Hepatitis C: Klinik, Verlauf und Therapie. *Schweiz. Rundschau Med.* 83(36):1005-1007
- Manns, M. (1999): Europäischer Konsens zu Hepatitis C. *Dt. Ärztebl.* 96(50):C-2367-2372
- Marcellin, P. (1999): Hepatitis C: The clinical spectrum of the disease. *J. Hepatol.* 31(Suppl. 1):9-16
- Marcellin, P., Boyer, N., Degott, C., Martinot-Peignoux, M., Duchatelle, V., Giostra, E., Areias, J., Erlinger, S., Benhamou, J.P. (1994): Long-term histologic and viral changes in patients with chronic hepatitis C who responded to alpha interferon. *Liver* 14(6):302-307

- Marrogi, A.J., Cheles, M.K., Gerber, M.A. (1995): Chronic hepatitis C. Analysis of host immune response by immunohistochemistry. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 119:232-237
- Martinot-Peignoux, M., Marcellin, P., Poteau, M., Castelnau, C., Boyer, N., Poliquin, M., Degott, C., Descombes, I., Le Breton, V., Milotova, V., Benhamou, J.P., Erlinger, S. (1995): Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 22(4):1050-1056
- Massagué, J., Cheifetz, S., Boyd, F.T., Andres, J.L. (1990): TGF- β receptors and TGF- β binding proteoglycans: Recent progress in identifying their functional properties. *Am. N.Y. Acad. Sci.* 593:59-72
- Matsuda, M., Yamanaka, T., Matsuda, A. (1982): Distribution of fibronectin in plasma and liver in liver diseases. *Clin. Chim. Acta* 118:191-199
- Matsui, S., Takahashi, T., Oyanagi, Y., Takahashi, S., Boku, S., Takahashi, K., Furukawa, K., Arai, F., Asakura, H. (1997): Expression, localization and alternative splicing pattern of fibronectin messenger RNA in fibrotic human liver and hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 27:843-853
- McCullough, A.J., Stassen, W.N., Wiesner, R.H., Czaja, A.J. (1987): Serum type III procollagen peptide concentrations in severe chronic active hepatitis: Relationship to cirrhosis and disease activity. *Hepatology* 7(1):49-54
- Menitove, J.E. (1988): Rationale for surrogate testing to detect non-A, non-B hepatitis. *Transfus. Med. Rev.* 2(2): 65-75
- Mondelli, M.U., Cristina, G., Filice, G., Rondanelli, E.G., Piazza, V., Barbieri, C. (1990): Anti-HCV positive patients in dialysis units? *Lancet* 336:244
- Morales, T.G., Sampliner, R.E., Bhattacharyya, A., Alter, M.J. (1995): Liver histology in anti-HCV-positive persons with normal or minimally elevated aminotransferases. *J. Clin. Gastroenterol.* 21(4):301-305

- Morikawa, P. (1991): Duplex doppler and colour doppler evaluation of hepatic venous flow patterns in chronic hepatic disease. *Jpn. J. Med. Ultrasonics* 18(9):22-30
- Murawaki, Y., Ikuta, Y., Koda, M., Nishimura, Y., Kawasaki, H. (1996): Clinical significance of serum hyaluronan in patients with chronic viral liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 11:459-465
- Mutimer, D.J., Bassendine, M.F., Kelly, P., James, O.F.W. (1989): Is measurement of type III procollagen amino propeptide useful in primary biliary cirrhosis? *J. Hepatol.* 9:184-189
- Niederau, C., Heintges, T., Häussinger, D. (1996): Treatment of chronic hepatitis C with α -Interferon: An analysis of the literature. *Hepato-Gastroenterol.* 43:1544-1556
- Niemelä, O. (1985): Radioimmunoassays for type III procollagen amino-terminal peptides in humans. *Clin. Chem.* 31(8):1301-1304
- Ninomiya, T., Yoon, S., Hayashi, Y., Sugano, M., Kumon, Y., Seo, Y., Shimizu, K., Kasuga, M. (1998): Hepatic fibrosis - Clinical significance of serum hyaluronic acid as a fibrosis marker in chronic hepatitis C patients treated with interferon- α : Histological evaluation by a modified histological activity index scoring system. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 13:68-74
- Noel, L., Guerois, C., Maisonneuve, P., Verroust, F., Laurian, Y. (1989): Antibodies to hepatitis C virus in haemophilia. *Lancet* 334:560
- Oberti, F., Valesesia, E., Pilette, C., Rousselet, M.C., Bedossa, P., Aubé, C., Gallois, Y., Riffet, H., Ma ga, M.Y., Penneau-Fontbonne, D., Calès, P. (1997): Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology* 113:1609-1616
- Odenthal, M., Neubauer, K., Barralle, F.E., Peters, H., Meyer zum Bürschenfelde, K.H., Ramadori, G. (1992): Rat hepatocytes in primary culture synthesize and secrete cellular fibronectin. *Exp. Cell Res.* 203:289-296

- Odenthal, M., Neubauer, K., Meyer zum Bürschenfelde, K.H., Ramadori, G. (1993): Localization and mRNA steady-state level of cellular fibronectin in rat liver undergoing a CCl₄-induced acute damage or fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1181:266-272
- Ohta, M., Hashizume, M., Kawanaka, H., Akazawa, K., Tomikawa, M., Higashi, H., Kishihara, F., Tanoue, K., Sugimachi, K. (1995): Prognostic significance of hepatic vein waveform by doppler ultrasonography in cirrhotic patients with portal hypertension. *Am. J. Gastroenterol.* 90(10):1853-1857
- Ohta, M., Hashizume M., Tomikawa, M., Ueno, K., Tanoue, K., Sugimachi, K. (1994): Analysis of hepatic vein waveform by doppler ultrasonography in 100 patients with portal hypertension. *Am. J. Gastroenterol.* 89(2):170-175
- Persico, M., Persico, E., Suozzo, R., Conte, S., De Seta, M., Coppola, L., Palmentieri, B., Sasso, F.C., Torella, R. (2000): Natural history of hepatitis C virus carriers with persistently normal aminotransferase levels. *Gastroenterology* 118:760-764
- Pilette, C., Rousselet, M.C., Bedossa, P., Chappard, D., Oberti, F., Rifflet, H., Maïga, M.Y., Gallois, Y., Calès, P. (1998): Histopathological evaluation of liver fibrosis: Quantitative image analysis vs semi-quantitative scores. *J. Hepatol.* 28:439-446
- Pinzani, M. (1995): Novel insights into the biology and physiology of the Ito cell. *Pharmac. Ther.* 66(2):387-412
- Plebani, M., Burlina, A. (1991): Biochemical markers of hepatic fibrosis. *Clin. Biochem.* 24:219-239
- Pontinha, N., Pessegueiro, H., Barros, H. (1999): Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis in asymptomatic chronic viral hepatitis B. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 59:343-348
- Popper, H., Paronetto, F., Schaffner, F., Perez, V. (1961): Studies on hepatic fibrosis. *Lab. Invest.* 10(2):265-290

- Popper, H., Udenfriend, S. (1970): Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations. *Am. J. Med.* 49:707-721
- Poynard, T., Bedossa, P., Opolon, P. (1997): Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 349:825-832
- Prince, A.M., Brotman, B., Grady, G.F., Kuhns, W.J., Hazzi, C., Levine, R.W., Millian, S.J. (1974): Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet* 2:241-246
- Pugh, R.N.H., Murray-Lyon, I.M., Dawson, J.L., Pietroni, M.C., Williams, R. (1973): Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Brit. J. Surg.* 60(8):646-649
- Purcell, R.H. (1993): The discovery of the hepatitis viruses. *Gastroenterology* 104: 955-963
- Pussel, B.A., Peake, P.W., Brown, M.A., Charlesworth, J.A. (1985): Human fibronectin metabolism. *J. Clin. Invest.* 76:143-148
- Raedsch, R., Stiehl, A., Waldherr, R., Mall, G., Gmelin, K., Götz, R., Walker, S., Czygan, P., Kommerell, B. (1982): Procollagen-type III-peptide serum concentrations in chronic persistent and chronic active hepatitis and in cirrhosis of the liver and their diagnostic value. *Z. Gastroenterol.* 20:738-743
- Ramadori, G., Knittel, T., Odenthal, M., Schwögler, S., Neubauer, K., Meyer zum Bürschenfelde, K.H. (1992): Synthesis of cellular fibronectin by rat liver fat storing (Ito) cells: Regulations by cytokines. *Gastroenterol.* 103:1313-1321
- Ramadori, G., Zöhrens, G., Manns, M., Rieder, H., Dienes, H.P., Hess, G., Meyer zum Bürschenfelde, K.H. (1991): Serum hyaluronate and type III procollagen amino-terminal propeptide concentration in chronic liver disease. Relationship to cirrhosis and disease activity. *Eur. J. Clin. Invest.* 21:323-330

- Ramvalho, F., Costa, A., Pires, A., Cabrita, P., Serejo, F., Pinto Correia, A., Fatela, N., Cloria, H., Lopes, J., Cortez Pinto, H., Marinho, R., Raimundo, M., Velosa, J., Batista, A., Carneiro de Moura, M. (2000): Correlation of genotypes and route of transmission with histologic activity and disease stage in chronic hepatitis C. *Dig. Dis. Sci.* 45(1):182-187
- Ramalingaswami, V., Purcell, R.H. (1988): Waterborne non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1:571-573
- Reesink, H.W., Bresters, D., van der Poel, C.L., Cuypers, H.T.M., Lelie, P.N. (1992): New developments in hepatitis C. *Scand. J. Gastroenterol.* 27 (Suppl. 194):82-86
- Reichard, O., Glaumann, H., Norkrans, G., Wejstål, R., Fryden, A., Schvacz, R., Weiland, O. (1994): Histological outcome in patients with chronic hepatitis C given a 60-week interferon alfa-2b treatment course. *Liver* 14:169-174
- Reichard, O., Glaumann, H., Weiland, O. (1994): Long-term histological outcome in patients with chronic hepatitis C treated repeatedly with interferon alpha-2b without sustained response. *Scand. J. Infect. Dis.* 26(4):383-389
- Risteli, J., Rohde, H., Timpl, R. (1981): Sensitive radioimmunoassays for 7s collagen and laminin: Application to serum and tissue studies of basement membranes. *Anal. Biochem.* 113:372-378
- Rohde, H., Vargas, L., Hahn, E., Kalbfleisch, H., Bruguera, M., Timpl, R. (1979): Radioimmunoassay for type III procollagen peptide and its application to human liver disease. *9*:451-459
- Scheig, R. (1998): Acute and chronic viral hepatitis. *Lippincott's Prim. Care Pract.* 2(4):390-397
- Schmid, M., Flury, R., Bühler, H., Havelka, J., Grob, P.J., Heitz, P.U. (1994): Chronic viral hepatitis B and C: An argument against the conventional classification of chronic hepatitis. *Virchows Arch.* 425(3):221-228

- Schneider, M., Voss, B., Högemann, B., Eberhardt, G., Gerlach, U. (1989): Evaluation of serum laminin P1, procollagen-III peptides and N-acetyl- β -glucosaminidase for monitoring the activity of liver fibrosis. *Hepato-Gastroenterol.* 36:506-510
- Schuppan, D., Jax, C., Hahn, E.G. (1999): Serummarker der Leberfibrose. *Dtsch. med. Wschr.* 124:1213-1218
- Seef, L.B., Buskell-Bales, Z., Wright, E.C., Durako, S.J., Alter, H.J., Iber, F.L., Hollinger, F.B., Gitnick, G., Knodell, R.G., Perillo, R.P., Stevens, C.E., Hollingsworth, C.G., National Heart, Lung, and Blood Institute Study Group (1992): Long-term mortality after transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. *N. Eng. J. Med.* 327:1906-1911
- Shapiro, R.S., Winsberg, F., Maldjian, C., Stancato-Pasik, A. (1993): Variability of hepatic vein doppler tracings in normal subjects. *J. Ultrasound Med.* 12:701-703
- Silva, A.E., Hosein, B., Boyle, R.W., Fang, C.T., Shindo, M., Waggoner, J.G., Hoofnagle, J.H., Di Bisceglie, A.M. (1994): Diagnosis of chronic hepatitis C: Comparison of immunoassays and the polymerase chain reaction. *Am. J. Gastroenterol.* 89(4):493-496
- Siringo, S., Bolondi, L., Gaiani, S., Sofia, S., Zironi, G., Rigamonti, A., Di Febo, G., Miglioli, M., Cavalli, G., Barbara, L. (1994): Timing of the first variceal hemorrhage in cirrhotic patients: Prospective evaluation of doppler flowmetry, endoscopy and clinical parameters. *Hepatology* 20(1):66-73
- Sterneck, M. (2000): Ätiologie des hepatozellulären Karzinoms. *Internist* 41:185-190
- Steven, D., Colquhoun, M.D. (1996): Hepatitis C. A clinical update. *Arch. Surg.* 131:18-23

- Stevens, C.E., Aach, R.D., Hollinger, F.B., Mosley, J.W., Szmunes, W., Kahn, R., Werch, J., Edwards, V. (1984): Hepatitis B virus antibody in blood donors and the occurrence of non-A, non-B hepatitis in transfusion recipients. *Ann. Intern. Med.* 101:733-738
- Strasser, S.I. (1996): Hepatitis C: Questions to be answered. *MJA* 164:132-133
- Suou, T., Hosho, K., Kishimoto, Y., Horie, Y., Kawasaki, H. (1995): Long-term decrease in serum N-terminal propeptide of type III procollagen in patients with chronic hepatitis C treated with interferon alfa. *Hepatology* 22(2):426-431
- Surrenti, C., Casini, A., Milani, S., Ambu, S., Ceccatelli, P., D'Agata, A. (1987): Is determination of serum N-terminal procollagen type III peptide (sPIIIP) a marker of hepatic fibrosis? *Dig. Dis. Sci.* 32(7):705-709
- Takamatsu, S., Nakabayashi, H., Okamoto, Y., Nakano, H. (1997): Noninvasive determination of liver collagen content in chronic hepatitis. Multivariate regression modeling with blood chemical parameters as variables. *J. Gastroenterol.* 32:355-360
- Tamkun J.W., Hynes, R.O. (1983): Plasma fibronectin is synthesized and secreted by hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 258(7):4641-4647
- Tassopoulos, N.C. (1996): Patterns of progression. Unpredictability and risk of decompensated cirrhosis. *Dig. Dis. Sci.* 41(Suppl 12):S41-S48
- Teichgräber, U.K.M., Gebel, M., Hecker, H., Benter, T., Manns, M.P. (1996): Bedeutung des Duplex-Geschwindigkeitshistogramms zur Diagnose der Leberzirrhose. *Fortschr. Röntgenstr.* 164(5):401-405
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.M., Martin, G.R. (1979): Laminin - A glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* 254(19):9933-9937

- Trautwein, C., Manns, M.P. (1999): Chronische Virushepatitis - Diagnostik, Therapie und Prognose. *Versicherungsmedizin* 51(1):3-11
- Ueno, T., Inuzuka, S., Torimura, T., Tamaki, S., Koh, H., Kin, M., Minetoma, T., Kimura, Y., Ohira, H., Sata, M., Yoshida, H., Tanikawa, K. (1993): Serum hyaluronate reflects hepatic sinusoidal capillarization. *Gastroenterol.* 105:475-481
- Verbaan, H., Bondeson, L., Eriksson, S. (1997): Noninvasive assessment of inflammatory activity and fibrosis (grade and stage) in chronic hepatitis C infection. *Scand. J. Gastroenterol.* 32:494-499
- Wake, K. (1971): „Sternzellen“ in the liver: Perisinusoidal cells with reference to storage of vitamin A. *Am. J. Anat.* 132(4):429-462
- Walsh, K.M., Fletcher, A., MacSween, R.N.M., Morris, A.J. (2000): Basement membrane peptides as markers of liver disease in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 32:325-330
- Weiner, A.J., Kuo, G., Bradley, D.W., Bonino, F., Saracco, G., Lee, C., Rosenblatt, J., Choo, Q.L., Houghton, M. (1990): Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 335:1-3
- Wiese, M., Bauer, C., Kretschmar, F. (1987): Untersuchungen zum krankheitstypischen Schubverhalten der NANB-Hepatitis. *Dtsch. Z. Verdau. Stoffwechselkrankh.* 47: 14-25
- Wong, V.S., Hughes, V., Trull, A., Wight, D.G.D., Petrik, J., Alexander, G.J.M. (1998): Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J. Viral Hepatitis* 5:187-192
- Yagura, M., Murai, S., Kojima, H., Tokita, H., Kamitsukasa, H., Hrada, H. (2000): Changes of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients with no response to interferon- α therapy: Including quantitative assessment by a morphometric method. *J. Gastroenterol.* 35:105-111

- Yamada, M., Fukuda, Y., Nakano, I., Katano, Y., Takamatsu, J., Hayakawa, T. (1998): Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis in hemophiliacs with hepatitis C virus-associated chronic liver disease. *Acta Haematol.* 99:212-216
- Ylätupa, S., Haglung, C., Mertaniemi, P., Vahtera, E., Partanen, P. (1995): Cellular fibronectin in serum and plasma: A potential new tumor marker? *British J. Cancer* 71:578-582
- Zeuzem, S., Roth, W.K., Herrmann, G. (1995): Virushepatitis C. *Z. Gastroenterol.* 33:117-13

VII. Anhang

VII.1. Abkürzungsverzeichnis

Alb	Albumin
ALT	Alaninaminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartataminotransferase
CAH	Chronisch aktive Hepatitis
cDNA	Komplementäre DNA
cFN	Zelluläres Fibronectin
Chron. Hep. C	Chronische Hepatitis C
CPH	Chronisch persistierende Hepatitis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal-Growth-Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FGF	Fibroblast-Growth-Factor
FKDS	Farbkodierte Duplexsonographie
HA	Hyaluronan (Hyaluronsäure)
HBc Ag	Hepatitis B core Antigen
HBs Ag	Hepatitis B surface Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HDV	Hepatitis D Virus
HV	Hepatic Vein
LN	Laminin
MEIA	Mikropartikel-Enzymimmunoassay
NANB	Non A Non B
PCHE	Pseudocholinesterase
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PDGF	Platelet-Derived-Growth-Factor
pFN	Plasmafibronectin
PIIINP	N-terminales Propeptid des Typ III Prokollagens
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
RIA	Radioimmunoassay
RIBA	Recombinant Immunosorbent Assay
RNA	Ribonukleinsäure
T-Bili	Gesamtbilirubin
tFN	Gesamtfibronectin
TGF	Transforming-Growth-Factor
TNF	Tumornekrosefaktor
ZIR	Zirrhose
γGT	Gammaglutamyltranspeptidase

VII.2. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

in Marburg:

Amon, Arnold, Aumüller, Bachem, Barth, Basler, Bauer, Baum, Baumgärtel, Baumgart, Bautz-Holzherr, Beato, Berndt, Daume, Doss, Ehlenz, Elsässer, Emons, Engel, Eschenbach, Feuser, Fruhstorfer, Fuhrmann, Ganz, Gemsa, Geus, Göke, Golenhofen, Görg, Gotzen, Gressner, Griss, Gröne, Groos, Grzeschik, Happle, Havemann, Hesse, Heubel, Hilgermann, Hoffmann, Huffmann, Kaffarnik, Kälble, Katschinski, Kern, Kleine, Kleinsasser, Klenk, Klose, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kropf, Lammel, Lang, Lennartz, Leppek, Löffler, Maisch, Mannheim, Mannherz, Mennel, Moosdorf, Müller, Mutters, Netter, Neurath, Oertel, Podszus, Pohlen, Portig, Prinz, Rausch, Remschmidt, Richter, Riedmiller, Rogausch, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schmidt-Rhode, Schmitz-Mohrmann, Schüffel, Schulz, Schumacher, Schwerk, Seifart, Seitz, Seyberth, Siegel, Siegrist, Slenczka, Steiniger, Steinmetz, Stiletto, Stinner, Sturm, Thomas, Voigt, Wagner, Weide, Weihe, Weingärtner, Wesemann, Westermann, Westphal, v. Wichert, Wiegand, Wilke

in Bad Mergentheim:

Bundschu, Müller, Rager

in Dumfries:

Isles, Rafferty

VII.3. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. R. Arnold und Herrn Prof. Dr. med. M. Katschinski für die freundliche Überlassung des Themas.

Für die Durchführung der klinisch-chemischen Tests danke ich der Abteilung Klinische Chemie und molekulare Diagnostik, seinerzeit unter der Leitung von Prof. Dr. med. A. M. Gressner, jetzt unter der Leitung von Prof. Dr. med. H. Renz.

Hier bin ich Herrn Dr. J. Kropf zu besonderem Dank verpflichtet für seine Hilfestellung und inhaltliche Beratung in Bezug auf den klinisch-chemischen Teil während der gesamten Arbeit und für die freundliche Durchsicht des Manuskriptes.

Frau Kosche danke ich für die Durchführung der Assays zur Bestimmung der Fibrosemarker.

Die farbkodierte Duplexsonographie der Lebervenen wurde durch Herrn Prof. Dr. med. C. Görg, Frau Dr. med. I. Restrepo und Herrn Prof. Dr. med. W. B. Schwerk durchgeführt, denen ich ebenfalls an dieser Stelle danke.

Herrn Prof. Dr. med. H. J. Gröne danke ich für die freundliche Nachbeurteilung einiger histologischer Präparate.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Biometrie für die Beratung bei den statistischen Fragestellungen.

Besonders danke ich Frau Dr. med. M. Frank für die Anregung des Themas und ihre engagierte Betreuung der Arbeit während des klinischen Teils und ihre wertvollen Hinweise und Hilfestellungen im theoretischen Teil dieser Promotionsarbeit.

Ich danke ganz herzlich meinem Ehemann Christoph Hettwer, meinen Eltern und Geschwistern, die durch vielfältige Hilfe und nicht zuletzt durch ihre moralische Unterstützung wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Promotionsarbeit hatten.